

Thesis

GIESSEN

1966

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. F. Ulbrich

Konservierung von Mykoplasmen des Schweines in verschiedenen Temperaturbereichen und nach Gefriertrocknung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Martin Scheer
Tierarzt aus Gräfenhainichen/Bez. Halle

Gießen 1966

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. F. Ulbrich

Konservierung von Mykoplasmen des Schweines
in verschiedenen Temperaturbereichen und nach
Gefriertrocknung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Martin Scheer
Tierarzt aus Gräfenhainichen/Bez. Halle

Gießen 1966

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan : Professor Dr. H. Bartels

Berichterstatter: Professor Dr. F. Ulbrich

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1966

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Einleitung</u>	2
3.	<u>Einleitung</u>	3
4.	<u>Einleitung</u>	4
5.	<u>Einleitung</u>	5
6.	<u>Einleitung</u>	6
7.	<u>Einleitung</u>	7
8.	<u>Einleitung</u>	8
9.	<u>Einleitung</u>	9
10.	<u>Einleitung</u>	10
11.	<u>Einleitung</u>	11
12.	<u>Einleitung</u>	12
13.	<u>Einleitung</u>	13
14.	<u>Einleitung</u>	14
15.	<u>Einleitung</u>	15
16.	<u>Einleitung</u>	16
17.	<u>Einleitung</u>	17
18.	<u>Einleitung</u>	18
19.	<u>Einleitung</u>	19
20.	<u>Einleitung</u>	20
21.	<u>Einleitung</u>	21
22.	<u>Einleitung</u>	22
23.	<u>Einleitung</u>	23
24.	<u>Einleitung</u>	24
25.	<u>Einleitung</u>	25
26.	<u>Einleitung</u>	26
27.	<u>Einleitung</u>	27
28.	<u>Einleitung</u>	28
29.	<u>Einleitung</u>	29
30.	<u>Einleitung</u>	30
31.	<u>Einleitung</u>	31
32.	<u>Einleitung</u>	32
33.	<u>Einleitung</u>	33
34.	<u>Einleitung</u>	34
35.	<u>Einleitung</u>	35
36.	<u>Einleitung</u>	36
37.	<u>Einleitung</u>	37
38.	<u>Einleitung</u>	38
39.	<u>Einleitung</u>	39
40.	<u>Einleitung</u>	40
41.	<u>Einleitung</u>	41
42.	<u>Einleitung</u>	42
43.	<u>Einleitung</u>	43
44.	<u>Einleitung</u>	44
45.	<u>Einleitung</u>	45
46.	<u>Einleitung</u>	46
47.	<u>Einleitung</u>	47
48.	<u>Einleitung</u>	48
49.	<u>Einleitung</u>	49
50.	<u>Einleitung</u>	50
51.	<u>Einleitung</u>	51
52.	<u>Einleitung</u>	52
53.	<u>Einleitung</u>	53
54.	<u>Einleitung</u>	54
55.	<u>Einleitung</u>	55
56.	<u>Einleitung</u>	56
57.	<u>Einleitung</u>	57
58.	<u>Einleitung</u>	58
59.	<u>Einleitung</u>	59
60.	<u>Einleitung</u>	60
61.	<u>Einleitung</u>	61
62.	<u>Einleitung</u>	62
63.	<u>Einleitung</u>	63
64.	<u>Einleitung</u>	64
65.	<u>Einleitung</u>	65
66.	<u>Einleitung</u>	66
67.	<u>Einleitung</u>	67
68.	<u>Einleitung</u>	68
69.	<u>Einleitung</u>	69
70.	<u>Einleitung</u>	70
71.	<u>Einleitung</u>	71
72.	<u>Einleitung</u>	72
73.	<u>Einleitung</u>	73
74.	<u>Einleitung</u>	74
75.	<u>Einleitung</u>	75
76.	<u>Einleitung</u>	76
77.	<u>Einleitung</u>	77
78.	<u>Einleitung</u>	78
79.	<u>Einleitung</u>	79
80.	<u>Einleitung</u>	80
81.	<u>Einleitung</u>	81
82.	<u>Einleitung</u>	82
83.	<u>Einleitung</u>	83
84.	<u>Einleitung</u>	84
85.	<u>Einleitung</u>	85
86.	<u>Einleitung</u>	86
87.	<u>Einleitung</u>	87
88.	<u>Einleitung</u>	88
89.	<u>Einleitung</u>	89
90.	<u>Einleitung</u>	90
91.	<u>Einleitung</u>	91
92.	<u>Einleitung</u>	92
93.	<u>Einleitung</u>	93
94.	<u>Einleitung</u>	94
95.	<u>Einleitung</u>	95
96.	<u>Einleitung</u>	96
97.	<u>Einleitung</u>	97
98.	<u>Einleitung</u>	98
99.	<u>Einleitung</u>	99
100.	<u>Einleitung</u>	100

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Literatur</u>	2
A. Bedeutung und Verbreitung von Mykoplasmen beim Schwein	2
B. Anzüchtung und Wachstumseigenarten von Schweinemykoplasmen	4
C. Bisher ermittelte Spezies	5
D. Konservierung von Mykoplasmen	6
III. <u>Eigene Untersuchungen</u>	10
A. Material und Methoden	10
1. Teststämme	10
2. Herstellung von Impfgut	11
3. Beimpfung, Bebrütung und weitere Behandlung der Eier	11
4. Nährboden zur Anzüchtung von Mykoplasmenkolonien	12
5. Methode zur Zählung der koloniebildenden Einheiten (kbE)	12
6. Konservierung der Stämme	16
7. Die Schutzmedien zur Gefriertrocknung	17
8. Das Einfrieren (Langsam- und Schnellmethode)	19
9. Die Gefriertrocknung	19
10. Bestimmung der Restfeuchte	20
11. Untersuchungen zur Prüfung der Lebensfähigkeit der Mykoplasmen, die nach Konservierung nicht mehr koloniebildungsfähig waren	21
B. Ergebnisse der Untersuchungen	23
a. Konservierung bei Zimmertemperatur	23
b. Konservierung im Kühlschrank bei + 4° C	24
c. Konservierung bei - 20° C	27
d. Konservierung bei - 30° C	29

e.	Konservierung bei - 74° C	31
f.	Gegenüberstellung der Überlebensraten nach langsamem und schnellem Einfrieren und anschließender Lyophilisation	32
g.	Überlebensraten der lyophilisierten Mykoplasmenstämme während 6 monatiger Konservierung	33
C.	Besprechung der Ergebnisse	34
D.	Zusammenfassung	38
IV.	Literaturverzeichnis	39
V.	Anhang (Tabellen) Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Im Rahmen von Untersuchungen über die Verbreitung und Bedeutung der beim Schwein vorkommenden Mykoplasmen * war es von praktischem Interesse, geeignete Konservierungsmöglichkeiten für diese Mikroorganismen zu finden. Insbesondere deshalb, weil die Anzüchtung aus Organmaterial nur über die Gewebekultur oder - wie am hiesigen Institut bevorzugt - über embryonierte Hühnereier sicher gelingt und zur Erhaltung der Stämme regelmäßig Eipassagen erforderlich sind. Aus praktischen Gründen ist man daher bestrebt, die Zwischenzeiten der Eiüberimpfungen möglichst lang zu halten, was zur Voraussetzung hat, die Lebensdauer der in geeigneter Weise konservierten Mykoplasmen zu kennen.

Diesbezügliche Schrifttumsangaben speziell über Schweinemykoplasmen sind bisher nur spärlich vorhanden und aus solchen über andere Mykoplasmen geht hervor, daß die Beeinflussung der Lebensfähigkeit durch Konservierungsmethoden je nach Spezies recht verschieden ist und Verallgemeinerungen nicht zulässig sind.

Deshalb sollten Untersuchungen zu dieser Frage durchgeführt werden, wobei die Lebensdauer repräsentativer Mykoplasmen - Stämme des Schweines bei Konservierung in bestimmten Temperaturbereichen ($+20^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C , -30°C , -74°C) und nach Gefriertrocknung in verschiedenen Schutzmedien zu bestimmen war. Um auch zu quantitativen Aussagen zu gelangen, wurden die nach bestimmten Zeiteinheiten noch vorhandenen Überlebensraten von koloniebildenden Einheiten mit Hilfe eines Plattenzählverfahrens ermittelt.

* Die Untersuchungen wurden durch Mittel des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten ermöglicht.

II. L I T E R A T U R

A. Bedeutung und Verbreitung von Mykoplasmen des Schweines

Die erst in der neueren Zeit aufgenommenen intensiven Bemühungen um die Erforschung von Mikroorganismen der Ordo Mycoplasmatales FREUNDT (1955) ((Sammelreferate: EDWARD (10), KÖHLER (26), HAYFLICK und CHANOCK (22) u. a.)) erstrecken sich auch auf die beim Schwein vorkommenden Mykoplasmen. Dabei erhielten diese Bestrebungen besondere Impulse durch die Vermutung, daß diese Mikroorganismen bei der Entstehung bestimmter Erkrankungen beteiligt seien, insbesondere der Enzootischen Pneumonie (EP) und der Rhinitis atrophicans (R.a.). So wird über das Vorkommen und die mutmaßlichen Krankheitsbeziehungen beim Schwein gefundener Mykoplasmen in einer größeren Anzahl von Publikationen berichtet, welche von DINTER (6), MONREAL et al. (31), SCHIMMEL und HUBRIG (33) und HARTWIGK (21) bereits zusammengestellt wurden.

Daß Mykoplasmen offenbar recht häufig bei Schweinen, insbesondere bei Ferkeln, gefunden werden, ergibt sich aus folgenden Untersuchungsergebnissen:

L'ECUYER et al. (29) isolierten aus 86 pneumonisch veränderten Schweinelungen in 51,5 % und aus grobsinnlich gesunden Lungen in 6,6 % der Fälle Mykoplasmen.

SWITZER (35) berichtete, daß *Mycoplasma hyorhinis* in 60 % der Nasenhöhlen und in 50 % der pneumonischen Lungen der Schweine in Iowa (USA) vorkomme.

In Schweden wurden von BAKOS und DINTER (3) bei 120 Ferkeln aus EP-Beständen in 62,4 % der Fälle Mykoplasmen festgestellt.

MONREAL et al. (31) führten 80 diagnostische Untersuchungen von EP- oder R.a.- kranken bzw.- verdächtigen Jungschweinen mit Hilfe des sog. Eitestes auf Mykoplasmenbefall durch: In 53 Fällen verlief besagter Test positiv, während eine Kontrollgruppe

von 12 Schweinen aus 8 EP- unverdächtigen Beständen durchweg negative Ergebnisse erbrachte. SCHIMMEL und HUBRIG (33) berichteten über Untersuchungen von 236 atrophisch veränderten und 254 unveränderten Nasenmuscheln von Schlachtschweinen. Aus Schleimhautproben wurden im ersten Fall zu 64 % und im zweiten Fall zu 32 % Mykoplasmen isoliert.

KLEY und MAYR (24) fanden in 12 von 207 Nasentupferproben von 94 Schweinen Mykoplasmen. Aus 10 EP- verdächtigen Herden waren von 22 Lungenproben 17 positiv, dagegen konnten aus 10 Lungen und 27 Nasentupferproben von 19 durch Kaiserschnitt gewonnenen und mutterlos in Isolierung aufgezogenen Schweinen bzw. deren Nachkommen in keinem Falle Mykoplasmen ermittelt werden.

Von HARTWICH und MÜLLER (19) konnten bei 70 % von 106 an EP und / oder R.a. erkrankten Jungschweinen aus landwirtschaftlichen Betrieben Oberhessens und bei 69 % von 59 klinisch gesunden Ferkeln aus unverdächtigen Beständen Mykoplasmen in den Lungen und / oder Nasenschleimhäuten nachgewiesen werden. Aus letzterer Gruppe waren von 19 Tieren zusätzlich auch Leber, Nieren und Milz untersucht worden, wobei 9 Ferkel in allen oder einem dieser Organe Mykoplasmen hatten.

Daraus schlossen die Untersucher, daß Mykoplasmen nicht nur im Respirationstrakt, sondern auch in Organen vorkommen, die nicht mit der Außenwelt in unmittelbarer Verbindung stehen.

B. Anzüchtung und Wachstumseigenarten von
Schweinemykoplasmen

Die Anzüchtung von Mykoplasmen aus Organmaterial von Schweinen gelingt i.d.R. nicht auf Plattenkulturen, sondern in flüssigen zellfreien Medien, in embryonierten Hühnereiern und in der Gewebekultur ((SWITZER (34), LECCE (28), L'ECUYER et al. (29), BAKOS und DINTER (3), MONREAL et al. (31), DINTER et al. (9); GOODWIN et al. (16), HARTWICH und MÜLLER (18,19), KLEY und MAYR (24), MARE und SWITZER (30)).

Erst nach Adaption an diese Substrate ist eine Kolonieentwicklung auf Plattenkulturen zu erwarten, wobei die Mehrzahl der Isolate einen Bakterienstamm (zumeist eine Mikrokokkenart) als Amme benötigen, indem sie nur in deren näherer Umgebung Kolonien bilden ((LECCE (28), BAKOS und DINTER (3), MONREAL et al. (31), HARTWICH und MÜLLER (18,19), KLEY und MAYR (24), MARE und SWITZER (30)).

Als Grundlage für die verhältnismäßig komplizierten und von den einzelnen Untersuchern recht unterschiedlich zusammengestellten zellfreien Kultursubstrate dienen Rinderherzinfusion oder für Gewebekulturen entwickelte Nährlösungen. Wie die meisten Mykoplasmenspezies benötigen auch die beim Schwein gefundenen Cholesterin und native Proteine zum Wachstum, so daß ein hoher Serumzusatz (zumeist vom Pferd) erforderlich ist. Genaue Angaben über derartige Medien erfolgten in den Publikationen von SWITZER (34), LECCE (28), MONREAL et al. (31), HARTWICH und MÜLLER (18), KLEY und MAYR (24) und MARE und SWITZER (30).

Die nach Definition von FREUNDT (13) für Mykoplasmen zu fordernden Eigenschaften sind bei den Schweinemykoplasmen vorhanden, insbesondere die charakteristische Form und Größe der Kolonien, wiewohl nicht selten untypische Kolonien aufzutreten pflegen, welche jedoch unter geeigneten Bedingungen die charakteristischen Merkmale zurückgewinnen können ((HARTWICH und MÜLLER (18)).

C. Bisher ermittelte Spezies

SWITZER (34) gebührt das Verdienst, als erster die häufig aus den Nasenschleimhäuten von Schweinen isolierten Mykoplasmen näher untersucht und sie dem Fundorte nach als Mycoplasma (M) hyorhinis bezeichnet zu haben. Aus seinen Darstellungen der Eigenschaften sind als die wohl wesentlichsten Kriterien zu entnehmen, daß die Ansprüche dieser Spezies an das Medium besonders hoch sind, daß sich nach Beimpfung von Hühnereiern bestimmte Läsionen am Embryo entwickeln und daß keine Pathogenität gegenüber kleinen Versuchstieren und Geflügel besteht. Unter sechs Wochen alte Ferkel zeigten dagegen nach i.p. Injektion ausgedehnte viszerale Läsionen. Weitere Möglichkeiten zur Abgrenzung gegen andere Mykoplasmenarten, insbesondere durch serologische Methoden, gab der Untersucher nicht an. Versuche, neutralisierende Antikörper gegen M. hyorhinis zu gewinnen, waren fehlgeschlagen.

Das von einer schwedischen Arbeitsgruppe zunächst als Virus angesehene Agens der enzootischen Pneumonie der Schweine (SEP-Agens) ((WESSLEN und LANNEK (36); LANNEK und WESSLEN (27); DINTER, BAKOS und BJÖRKLUND (7); DINTER, WESSLEN, LANNEK (9)) wurde 1962 von BAKOS et al. (2) ebenfalls als Mykoplasma identifiziert. Als spezifische Eigenschaft dieser zunächst weiterhin als SEP-Agens bezeichneten Spezies hoben die Untersucher ein symbiontisches Wachstum hervor: erst in Gegenwart und in unmittelbarer Nähe einer Staphylokokkenart war regelmäßig ein typisches Koloniewachstum zu erreichen ((BAKOS und DINTER (3)). Durch weitere Untersuchungen ((DINTER, DANIELSON, BAKOS (8)) gelang auch eine serologische Differenzierung. Porzine M.-Stämme ließen sich serologisch und kulturell in zwei Gruppen einteilen: die 1. Gruppe umfaßte die sog. SEP - Stämme und Switzers M. hyorhinis, da diese aus Organmaterial besser über belebte Medien (Gewebekultur und Hühnereier) als in zellfreien angezüchtet werden konnten und das Ammenphänomen zeigten. Serologisch waren diese Stämme ebenfalls identisch.

Die 2. Gruppe, aus sog. B - Stämmen bestehend, war hinsichtlich der Nährmedien weniger anspruchsvoll und ließ sich über zellfreie Kulturböden ohne Amme isolieren. Serologisch konnten 5 Serotypen unterschieden werden, von denen sich einer durch die als *M. granularum* ((BAKOS (1), MARE und SWITZER (30)) bezeichnete Spezies präsentierte.

1965 glaubten MARE und SWITZER (30), aus Pneumonielungen eine weitere *M.*-Spezies ermittelt zu haben. Da sich damit experimentell pneumonische Veränderungen erzielen ließen, nannten sie diese *M. hyopneumoniae*. Auch diese Spezies wuchs in Symbiose mit einem Staphylokokkenstamm besser. Unterscheidungsmerkmale gegenüber *M. hyorhinis* teilten die Untersucher nicht mit.

Im gleichen Jahr identifizierten GOODWIN et al. (15) ihr in pneumonischen Schweinelungen gefundenes J - Agens ((GOODWIN et al. (15)) ebenfalls als Mykoplasmenart und benannten diese *M. suis* *pneumoniae*, weil auch damit die bei der enzootischen Pneumonie der Schweine typischen Lungenveränderungen experimentell hervorgerufen werden konnten. Wegen gewisser methodischer Mängel an den Experimenten von MARE und SWITZER (30) glaubten GOODWIN et al. (15), den Namen *M. hyopneumoniae* nicht übernehmen zu können.

D. Konservierung von Mykoplasmen

Über Untersuchungen zur Frage der Konservierung von Schweinemykoplasmen wurde in dem mir zugänglichen Schrifttum nur in einem Falle kurz berichtet. SWITZER (34) führte an, daß Stämme von *M. hyorhinis* bei Kühlschranktemperatur von + 4° C gewöhnlich nach 3 Wochen abgestorben waren, daß sie sich dagegen bei - 40° C länger als 10 Monate gehalten und in lyophilisiertem Zustand, bei + 4° C aufbewahrt, sogar noch länger als 1 Jahr gelebt hätten.

Zur weiteren Orientierung über diese Frage mußte auf Berichte über mit anderen Mykoplasmen durchgeführte Untersuchungen zurückgegriffen werden:

Schon 1925 berichteten BRIDRE und DONATIEN (4), daß der Erreger der Agalaktie der Schafe und Ziegen unter aeroben Bedingungen bei + 37° C nur etwa 1 Monat lang vermehrungsfähig war, wogegen er sich unter anaeroben Bedingungen 22 Monate lang hielt. Mit Vaseline versiegelte flüssige Kulturen wuchsen nach 5 Monaten nicht mehr, wenn sie bei 0° C und + 6 bis + 12° C gelagert waren.

SABIN (32) lyophilisierte Mykoplasmen und lagerte sie bei Zimmertemperatur. Noch nach einem Jahr ließen sich Subkulturen anlegen.

GRAY und TURNER (17) untersuchten die Lebensfähigkeit und immunisierende Wirkung von gefriergetrockneten Kulturvakzinen von *M. mycoides* und fanden, daß etwa 1 % der Organismen den Lyophilisationsprozeß und eine 41 monatige Lagerung bei + 4° C überlebt hatten.

CONRAD (5) konnte bei einem gefriergetrockneten aviären Mykoplasmenstamm noch nach 27 monatiger Lagerung bei + 4° C eine Überlebensrate von 23,8 % nachweisen. Der Stamm war in zellfreiem Medium (PPLO-Brühe) lyophilisiert worden. Von 44 lyophilisierten Stämmen enthielten alle nach 14 Monaten noch lebensfähige Keime.

Bouillonkulturen von Hühnermykoplasmen konnte HARTWIGK (20) acht Wochen lang im Kühlschrank aufbewahren, ohne daß die Entwicklungsfähigkeit verloren ging.

KÖHLER (26) beobachtete bei - 20° C eingefrorene Mykoplasmen bis zu einem Monat und sah zwar eine starke Abnahme der lebensfähigen Keime, jedoch waren genug übrig geblieben, um den Stamm fortzuzüchten.

KLIENEBCERGER-NOBEL (25) teilte mit, daß PPLO-Kulturen bei Brutschrank- und Zimmertemperaturen schnell abstarben. Auf Kulturplatten bei + 4° C aufbewahrte Kolonien blieben etwa

14 Tage lebensfähig, während flüssige Mykoplasmenkulturen bei dieser Temperatur schlechter zu halten waren. Bouillonkulturen konnten bei -20°C oder noch niedrigeren Temperaturen etwa 6 bis 12 Monate lang gelagert werden, ohne daß eine Überimpfung erforderlich wurde.

FLIR (11) ermittelte für aviäre Mykoplasmenstämme die zur Gefriertrocknung günstigste Schutzlösung, sowie die am besten geeigneten Einfrier- und Lagerungstemperaturen und kam zu den folgenden Ergebnissen:

Von Aqua dest., 0,85 %iger NaCl-Lösung, Magermilch und Mixtura desiccans erwiesen sich die beiden letzten Substrate als Schutzlösungen als besonders gut geeignet.

Mit der Methode des langsamen Einfrierens (bei -20°C in 30 Min.) ließen sich in Magermilch und Mixtura desiccans höhere Überlebensraten erzielen als nach sturzartigem Einfrieren (bei -70°C in 2 bis 3 Sek.).

Nach 4 monatiger Lagerung des Trockengutes unter Vakuum ergab sich eine Überlebensrate von 42,29 % in Magermilch und von 89,85 % in Mixtura desiccans. Die Lagerung der Kulturen bei Zimmertemperatur zeigte Überlebensraten von 6,2 % in Magermilch und 35,34 % in Mixtura desiccans.

Interessanterweise wurde beobachtet, daß die in Mixtura desiccans suspendierten Mykoplasmen in sehr viel kleineren Kolonien auswuchsen als die in Magermilch konservierten. Die Untersucherin hält eine Beeinflussung durch das der Mixtura desiccans zugesetzte Rinderserum für möglich.

Die wohl umfassendsten Untersuchungen zur Frage der Konservierung von Mykoplasmen führte KELTON (23) durch, der die Lebensfähigkeit von 26 Stämmen (19 aviäre, 3 humane, 3 canine und 1 saprophytischer) in gefriergetrocknetem Zustande und nach Lagerung über längere Zeiträume in verschiedenen Temperaturbereichen bestimmte. Auch die Wirkung des abwechselnden Einfrierens und Auftauens auf diese Organismen wurde untersucht:

Alle Stämme überlebten die Gefriertrocknung und eine 3- oder 4 -jährige Lagerung bei $- 26^{\circ} \text{C}$ bzw. $- 56^{\circ} \text{C}$ in lyophilisiertem Zustande. Dabei handelte es sich um Bouillonkulturen, denen Magermilch zu gleichen Teilen zugesetzt worden war.

Nach 12 monatiger Konservierung der in Bouillon gezüchteten Stämme bei $- 65^{\circ} \text{C}$ konnten keine Veränderungen des Koloniewachstums bemerkt werden. Je nach Stamm war die Absterberate unterschiedlich hoch: Ein aviärer Stamm hatte nach 12 Monaten etwa 90 % der ursprünglich vorhandenen lebensfähigen Einheiten verloren, wobei 85 % dieses Verlustes schon nach 1 monatiger Lagerung entstanden war. Der resistensteste Stamm dagegen (ebenfalls ein aviärer) hatte nach Einfrieren, 12 monatiger Lagerung und anschließendem Auftauen nur einen 15 %igen Verlust. Die übrigen Stämme lagen zwischen diesen beiden Extremen.

Nach Lagerung der Bouillonkulturen bei $- 26^{\circ} \text{C}$ überlebten zwar alle Stämme den 10. Monat, waren jedoch dann vielfach im Koloniewachstum beeinflusst; es zeigten sich Kümmerformen, oder die Bebrütungszeit mußte wesentlich verlängert werden, um überhaupt Kolonien zu erhalten. In diesem Zusammenhang warf der Untersucher die Frage auf, ob derartige Organismen überhaupt noch repräsentativ für den Originalstamm seien. Es bestünde die Möglichkeit, daß dadurch nur bestimmte besonders resistente Organismen selektiert worden seien.

Durch Lagerung bei $+ 5^{\circ} \text{C}$ wurden die Stämme recht unterschiedlich beeinflusst: Der saprophytische Stamm hatte noch nach 9 Wochen keine Verluste an lebensfähigen Keimen, während ein caniner bereits nach 3 Wochen abgestorben war. Vier weitere Stämme (3 aviäre und 1 humaner) waren ebenfalls noch nach 9 Wochen lebensfähig.

Ebenso unterschiedlich war die Wirkung des wiederholten Einfrier - Auftau - Prozesses auf die einzelnen Stämme, welche jedoch im ganzen gesehen diese Behandlung besser überstanden als *E. coli*. KELTON sah den Grund für diese hohe Resistenz in der weich-elastischen Beschaffenheit der Zellmembran der Mykoplasmen.

III. Eigene Untersuchungen

A. MATERIAL UND METHODEN

1. Teststämme

Als Teststämme für alle folgenden Untersuchungen wurden verwendet:

1. Ein schwedischer SEP-Stamm, als "Bakos" bezeichnet, der von einem an enzootischer Pneumonie erkrankten Ferkel stammte.
2. Ein amerikanischer Mycoplasma hyorhinis-Stamm, genannt "Switzer", da von Dr. Switzer (Iowa/USA) aus einem Ferkel isoliert.
Dieser, wie auch der schwedische SEP-Stamm, wurde uns von Herrn Dr. Bakos, Stockholm, überlassen.
3. Ein deutscher Stamm, mit "62 L" bezeichnet. Wurde am hiesigen Institut aus der Lunge eines an enzootischer Pneumonie erkrankten Ferkels isoliert, das aus einem bäuerlichen Betrieb Oberhessens stammte.

Die Anzahl der Eipassagen der Stämme Bakos und Switzer war nicht bekannt, am hiesigen Institut wurden sie, wie auch der Stamm 62 L bis zum Beginn dieser Versuche 7 mal über embryonierte Hühnereier passagiert.

Alle 3 Stämme hatten die für Schweinemykoplasmen typischen Eigenschaften: Die Anzüchtung und Weiterführung gelang stets auf embryonierten Hühnereiern, jedoch nicht oder nur selten - wenigstens zunächst - in flüssigen zellfreien Medien. Erst nach mehreren Eipassagen war eine Züchtung in Bouillonsubstrat möglich, wobei insofern Unterschiede bestanden, als der Stamm Switzer regelmäßig und auch verhältnismäßig üppig wuchs, das Wachstum der beiden anderen jedoch recht spärlich war und auch oftmals aus noch nicht geklärten Gründen spontan abfiel.

Auf Plattenkulturen bildeten alle 3 Stämme nur in Gegenwart

und in mehr oder weniger unmittelbarer Nähe einer Staphylokokkenanname typische Kolonien.

Gegenüber 5 bis 7 Tage bebrüteten Hühnereiern verhielten sich die Stämme ebenfalls gleich: Nach Dottersackbeimpfung war die Absterbequote sehr unregelmäßig, das Maximum der Sterblichkeit lag zwischen dem 5. und 8. Tage p. i.. Fast immer wurden Läsionen am Embryo bemerkt, wie diffuse Hauthyperämie, Hautulzerationen, insbesondere in der Occipitalgegend, Ödematisierung und offene Leibeshöhle als Zeichen eines verzögerten Verschlusses. Die 3 Teststämme wurden mir in Eidottermaterial tiefgefroren zur Verfügung gestellt. Die weitere Bearbeitung geschah wie folgt:

2. Herstellung von Impfgut

Das bei + 4° C aufgetaute Dottermaterial wurde mit m/50 phosphatgepufferter NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 1 versetzt und gründlich durchmischt. Danach erfolgte Zugabe von 1 000 I.E. Penicillin und 500 Gamma Streptomycin pro ml (beides in m/50 phosphatgepufferter NaCl-Lösung gelöst). Nach kurzem Durchschütteln und etwa 2 stündiger Kühlschranklagerung war das Material impffertig.

3. Beimpfung, Bebrütung und weitere Behandlung der Eier

Die Beimpfung der 5 bis 6 Tage vorbebrüteten Hühnereier erfolgte vom stumpfen Eipol aus durch die Luftkammer in den Dottersack mit 0,2 ml des vorbereiteten Impfgutes. Die infizierten Eier wurden sodann sofort weiter bei + 37° C bebrütet, täglich einmal gedreht und durchleuchtet. Die nach dem 1. und 2. Tage p.i. abgestorbenen Eier wurden verworfen, da sie erfahrungsgemäß zumeist bakteriell kontaminiert waren. Späterhin abgestorbene und auch diejenigen, welche den 10. Tag p.i. überlebt hatten und am 11. Tage p.i. abgetötet worden waren, wurden unverzüglich unter sterilen Kautelen am stumpfen Pol in der üblichen Weise geöffnet. Um Dottersackinhalt und AAF streng

getrennt zu gewinnen, wurde der Inhalt vorsichtig in eine sterile Glasschale (Durchmesser 8,5 cm) ausgegossen, wobei darauf zu achten war, daß der Dottersack vorerst nicht zerriß. Sodann wurden AAF und Dottersackinhalt in entsprechenden Portionen zur Konservierung bzw. zur Gefrieretrocknung abpipettiert.

4. Nährboden zur Anzüchtung von Mykoplasmenkolonien

Zum Nachweis der Lebensfähigkeit der Mykoplasmen-Stämme und zur Zählung der koloniebildenden Einheiten (kbE) wurde der von MONREAL et al. (31) und HARTWICH und MÜLLER (18) beschriebene PPLO-Agar verwendet, dessen Zusammensetzung und Zubereitung hier angegeben sei:

Zubereitung des PPLO-Agarmediums (Difco) aus Rinderherzinfusion nach Angabe des Herstellers. Zusätze von 0,5 % Pepton (Difco), 0,5 % NaCl und 0,1 % Glukose. Nach dem Sterilisieren im Autoklaven (30 Min.) wurde dem auf etwa 50° C abgekühlten Nährboden 1 % Hefeautolysat und 20 % steril gewonnenes Pferdeserum zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,6 mit Hilfe des Beckmann-pH-Meters eingestellt. Das Ausgießen des fertigen Agars erfolgte in flache, 1 cm hohe Petrischalen, wie sie von FORTNER (12) für seine Methode zur Anaerobenzüchtung verwendet wurden.

Da bei früheren Untersuchungen im Institut die Erfahrung gemacht worden war, daß nicht jedes Pferdeserum bei der Anzüchtung von Schweinemykoplasmenkolonien gleichermaßen gut geeignet war, wurde bei der Herstellung der Nährböden insofern eine Standardisierung herbeigeführt, als immer vom gleichen Pferd stammendes Serum zugesetzt wurde.

Alle zur Verwendung gekommenen Kulturplatten waren am Vortage frisch hergestellt worden.

5. Methode zur Zählung der koloniebildenden Einheiten (kbE)

Zur Ermittlung der Anzahl lebender Mykoplasmen pro ml Eiflüssigkeit, d.h. der koloniebildenden Einheiten, mußte eine Methode nach dem Prinzip des Koch'schen Plattenverfahrens gefunden werden,

wobei die Besonderheit zu berücksichtigen war, daß das Koloniewachstum der Mykoplasmen erst durch symbiotische Züchtung mit einem Staphylokokkenstamm zu erwarten war. Nach Erprobung mehrerer Verfahren hatte sich das folgende als besonders geeignet erwiesen:

Mit einem scharfkantigen, quadratischen Metallrahmen, der durch einen Handgriff eine stempelartige Verwendung gestattete, wurde die Fläche auf der Agarplatte markiert, auf welcher die mykoplasmenhaltige Eiflüssigkeit (bzw. Bouillon) gleichmäßig zu verteilen war. Außerhalb des Quadrates, unmittelbar entlang der Markierungslinie wurde sodann die Staphylokokkenrinne mit Hilfe einer Normalöse ausgestrichen. Der "Stempel" war derart konstruiert, daß eine Zusammenhangstrennung, d.h. eine Ausstanzung der Agarschicht nicht möglich war, sondern nur ein etwa 1 mm breiter und ebenso tiefer keilförmiger Graben entstand. Dieser bildete eine recht wirkungsvolle Barriere gegen das Überlaufen des Ammenstammes auf das "Mykoplasmenquadrat", gleichzeitig war aber doch eine Diffusion der die Koloniebildung der Mykoplasmen fördernden Ammenstoffe gewährleistet.

Die Seitenlänge des Quadrates betrug 3,5 cm, die mittels Blutzuckerpipetten aufgebrachte Eiflüssigkeit war jeweils 0,01 ml. Der Ammenstamm war von Dr. Bakos, Stockholm zur Verfügung gestellt worden, und stammte von Dr. Terpstra, Rotterdam. Es handelte sich dabei um einen nicht näher definierten Staphylokokkenstamm, welcher weißes Pigment bildete und eine leichte Hämolyse auf 10 %igem Schafblutagar zeigte.

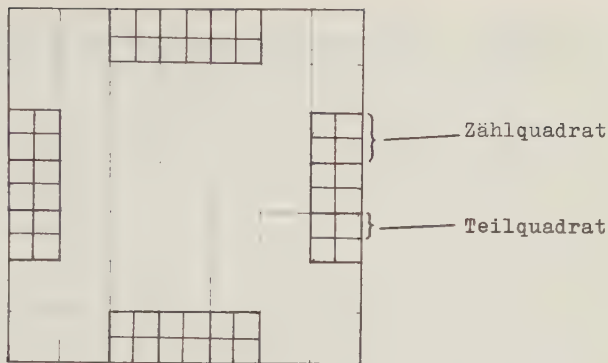
Um ein Auszählen der aus dem Eimaterial außerordentlich dicht wachsenden Mykoplasmenkolonien zu ermöglichen, waren Verdünnungsreihen erforderlich. Dabei erwiesen sich zunächst Verdünnungen von 1 : 10 000 und 1 : 1 000 als geeignet, nach Abfall der Keimdichte durch Konservierungseinflüsse waren solche von 1 : 100 und 1 : 10 günstiger. Als Verdünnungsmedium wurde m/50 phosphatgepufferte NaCl-Lösung verwendet.

Die auf die beschriebene Weise vorbereiteten Kulturplatten wurden bei + 37° C, 85 % relativer Luftfeuchte und etwa 15 %iger CO₂-Konzentration im Brutschrank 3 Tage lang bebrütet. Besonders wesentlich zur quantitativen Erfassung der Überlebensrate konservierter Mykoplasmen war die richtige Wahl der Bebrütungsdauer. Von den verschiedenen Untersuchern ((DINTER, DANIELSSON und BAKOS (8), GOODWIN et al. (15), HARTWICH und MÜLLER (18), MARE und SWITZER (30)) war zwar übereinstimmend berichtet worden, daß die Kolonien nach 2-3 tägiger Bebrütung sichtbar gewesen seien, jedoch ließ sich daraus nicht ohne weiteres folgern, daß nach dieser Zeit a l l e kbE zu Kolonien auswüchsen - oder mit anderen Worten, daß stets mit der gleichen Wachstumsgeschwindigkeit gerechnet werden könne; zumal SWITZER (34) beobachtet hatte, daß sich noch nach 6 tägiger Bebrütung einige Kolonien entwickelt hatten, nachdem innerhalb von 48 Stunden die Mehrzahl der Kolonien sichtbar gewesen sei. (Dazu muß allerdings betont werden, daß SWITZER einen Nährboden verwendet hatte, der mit dem von mir verwendeten nicht vergleichbar war.) Deshalb war durch zahlreiche Vorversuche festgestellt worden, daß nach einer 3 Tage währenden Bebrütung die Koloniebildung der drei Teststämme abgeschlossen war. Zwar hatten die Kolonien nach dem 4. und 5. Bebrütungstage vielfach an Größe zugenommen, und auch die zentralen Erhebungen erschienen dann häufig deutlicher ausgeprägt, jedoch konnte auch nach 8 tägiger Bebrütung keine Zunahme der Kolonienmenge bemerkt werden.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe einer selbstgefertigten Zähl-scheibe aus 1 mm starkem Plexiglas, auf welche ein Quadrat eingeritzt war, das in seiner Abmessung dem "Mykoplasmenquadrat" auf der Kulturplatte genau entsprach (Seitenlänge 3,5 cm). Mittels Tesafilm wurde diese Zähl-scheibe so an der Unterseite des Petrischalenbodens befestigt, daß beide Quadrate deckungsgleich waren.

Durch den durchsichtigen Nährboden hindurch konnte dann die Unterteilung in Zählquadrate, von denen jedes wiederum aus 4 Teilquadraten bestand, gut erkannt werden (Abb. 1).

Abb. 1



Die seitliche Anordnung der Zählfelder mußte wegen der außerordentlich ungleichmäßigen Verteilung der im "Mykoplasmenquadrat" gewachsenen Kolonien getroffen werden; denn in unmittelbarer Nähe der Amme, d.h. bis zu einer Entfernung von etwa 1,0 cm entlang des Staphylokokkenimpfstriches, war der Koloniebesatz am dichtesten, um dann allmählich nach dem Zentrum des Quadrates zu abzunehmen. Zur Zählung mußten demnach Bezirke gewählt werden, die in optimalen Wachszonen lagen, weil nur dort die Wahrscheinlichkeit bestand, daß alle kbE sich zu sichtbaren Kolonien entwickeln konnten. Die besonders dicht bewachsenen Quadratecken wiederum hielt ich deshalb zur Auszählung für ungünstig, da hier die gleichmäßige Verteilung des Eimaterials (Bouillonkultur) nicht vollauf gewährleistet war. Es bestand die Möglichkeit, daß durch besondere Anhäufung von mykoplasmenhaltigem Material eine zu hohe Koloniezahl ermittelt werden könnte. Um weiterhin derartige Verteilungsfehler zu vermeiden, wurden an allen 4 Seiten jeweils 3 Zählquadrate (Seitenlänge 0,5 cm) = 12 Teilquadrate (Seitenlänge 0,25 cm) ausgezählt. Die ermittelte Summe der Kolonien wurde sodann durch 12 dividiert, um einen Mittelwert zu erhalten. Dieser wurde mit der Zahl 49 multipliziert, weil die Fläche des "Mykoplasmenquadrates" gleich der Summe der Fläche von 49 Zählquadraten war. Die auf diese Weise errechnete Zahl ergab

die Anzahl der kbE pro 0,01 ml des geprüften mykoplasmenhaltigen Materials. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung ließ sich der Lebendkeimgehalt pro 1 ml Ausgangsmaterial leicht errechnen. Um zu Fehlern führende Zufälligkeiten möglichst niedrig zu halten, wurden für jede Keimzahlbestimmung 6 Platten ausgezählt; jeder im Anhang ersichtliche Wert der kbE stellt somit einen aus 6 Plattenauszahlungen errechneten Mittelwert dar.

Das Auszählen wurde unter einem Plattenmikroskop (Zeiss Stereo II) mit 40- oder 60-facher Vergrößerung bei durchfallendem, etwas dezentralisiertem Licht vorgenommen, so daß durch geringe Schattenwirkung ein möglichst plastisches Bild der Nährbodenoberfläche entstand.

6. Konservierung der Stämme

Die Konservierung von mykoplasmenhaltigen Eiflüssigkeiten (AAF und bidottermaterial) erfolgte in geschlossenen Agglutinationsröhrchen bei Zimmertemperatur und Temperaturen von $+ 4^{\circ}\text{C}$, $- 20^{\circ}\text{C}$, $- 30^{\circ}\text{C}$ und $- 74^{\circ}\text{C}$. Die Schwankungsbreite der Zimmertemperatur lag etwa zwischen $+ 19^{\circ}\text{C}$ und $+ 25^{\circ}\text{C}$ und war von verschiedenen Einflüssen abhängig, wie Außentemperatur, Sonneneinstrahlung, Innenheizung usw.. Von den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben wurden alle 48 Stunden die zur Keimzählung benötigten Mengen steril entnommen.

Die Aufbewahrung der Röhrchen bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ erfolgte im Kühlschrank, der diese Temperatur ziemlich konstant hielt. Gewisse Temperaturschwankungen waren auch hier unvermeidlich, da der Kühlschrank während der täglichen Arbeitszeit mehrfach geöffnet wurde. Die zur Keimzählung erforderliche Materialentnahme erfolgte in 10- bzw. späterhin 5- täglichen Intervallen, wobei darauf geachtet wurde, daß sich das weiterhin zu konservierende Material nicht wesentlich erwärmen konnte.

Zur Konservierung bei -20°C und -30°C standen Tiefkühltruhen zur Verfügung, die diese Temperaturen während der Versuchsdauer sehr konstant hielten. Pro Teststamm wurden, wenn möglich, 20 Agglutinationsröhrchen mit 0,5 ml Eiflüssigkeit (jeweils 10 mit AAF und Eidotter) eingelegt. Zu der monatlich durchgeführten Keimzählung wurden die entsprechenden Röhrchen entnommen, das Material bei Zimmertemperatur aufgetaut und späterhin verworfen. Gewisse Schwierigkeiten ergaben sich mit dem bei diesen Temperaturen gelagerten Eidottermaterial. Dieses war nach dem Auftauen so zähflüssig, daß es sich beim Anlegen von Verdünnungsreihen nicht ohne weiteres löste. Deshalb mußten die Röhrchen zunächst mit dem Verdünnungsmedium im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 5 beschickt und so lange mit der Hand geschüttelt werden, bis das Material wieder homogen war. Auch die Konservierung bei -74°C wurde in einer Tiefkühltruhe vorgenommen. Da diese jedoch mehrfach wegen technischer Mängel ausfiel, konnten nur die Ergebnisse einer Versuchsdauer von etwa 2 Monaten überblickt werden. Die Beschickung, Probeentnahmen und auch die Behandlung des Eidottermaterials geschah in gleicher Weise wie bei den Konservierungsversuchen von -20°C und -30°C . Abweichend davon wurde jedoch auch schon 24 Stunden nach dem Einlegen des Materials eine Keimzählung durchgeführt, um den Einfluß des sturzartigen Einfrierens festzustellen.

7. Die Schutzmedien zur Gefriertrocknung

Außer in Dottersackinhalt und AAF wurden die 3 Stämme auch in PPLO-Bouillon, Mixture desiccans nach FRY (14) und Magermilch mit 7,5 % Glukosezusatz lyophilisiert, um die Eignung dieser verschiedenartigen Substrate als Schutzmedien vergleichend zu untersuchen.

Die Zusammensetzung der PPLO-Bouillon war der des PPLO-Nährbodens sehr ähnlich. Anstelle des PPLO-Mediums (Difco), welches einen Agartzusatz hatte, wurde lediglich Bacto PPLO-Broth w/o CV (Difco) verwendet. Zur Verhinderung des Wachstums

eventuell vorkommender bakterieller Kontaminanten wurden 1 000 I.E. Penicillin pro ml und Thalliumacetat in einer Endverdünnung von 1 : 2 000 zugesetzt. Der pH-Wert wurde wiederum auf 7,6 eingestellt. Nach Beimpfung der jeweils 50 ml Kulturflüssigkeit enthaltenden Kölbchen mit 1,0 ml mykoplasmenhaltiger AAF wurde außerdem DPN $\approx \beta$ -Diphosphopyridinnucleotid in einer Konzentration von 0,01 % zugesetzt. Dadurch konnte nach bisher im Institut gesammelter Erfahrung eine Verbesserung des sehr zarten Wachstums in der Bouillon erreicht werden. Zur Bebrütung bei + 37° C wurden die Kölbchen auf einer schaukelähnlichen Vorrichtung ständig in langsamer Bewegung gehalten, da auch dadurch eine höhere Keimdichte als in unbewegten Kulturen erzielt wurde. Bewachsene Kulturen waren nur schwach getrübt und hatten einen zarten, leicht aufschüttelbaren Bodensatz. Bevor die zur Gefriertrocknung vorgesehene Anzahl von Lyophilisationsampullen mit je 1,0 ml Bouillonkultur beschickt wurde erfolgte die Kontrolle auf bakterielle Verunreinigung (auf 10 %igem Schafblutagar) und die Entnahme zur Keimzählung.

Mixtura desiccans nach FRY setzte sich aus 75 % Rinder Serum und 25 % gewöhnlicher Bouillon mit einem Anteil von 7,5 % Glukose zusammen. Das Rinder Serum wurde nach zweimaligem Filtrieren (Seitz-Filter Nr. EKS II Größe 6) der sterilisierten und mit 7,5 % Glukose versetzten Nährbouillon zugegeben. Der pH-Wert betrug 7,6.

Die Magermilch wurde durch Zentrifugieren (30 Min. bei 3 000 U/Min.) aus Vorzugsmilch gewonnen und mit 7,5 % Glukose versetzt. Der pH-Wert betrug nach Sterilisation 6,0.

Der Zusatz von Mykoplasmen zur Mixtura desiccans und Magermilch erfolgte auf die gleiche Weise:

Jeweils 48 ml einer 48 stündigen Mykoplasmen-Bouillonkultur wurden bei 12 500 U/Min. = 18 800 g 30 Minuten lang zentrifugiert (Sorvall-Superspeed RC 2), und der Bodensatz des Zentrifugenbechers in 2,0 ml des entsprechenden Schutzmediums mit Hilfe von Glasperlen suspendiert. (Die Zentrifugenbecher waren

aus Metall und konnten sterilisiert werden). Nachdem auf diese Weise eine gleichmäßige Verteilung der Mykoplasmen im Schutzmedium erfolgt war, wurde jeweils 1,0 ml der Suspension in Lyophilisationsampullen abgefüllt. Die Keimzahl wurde sowohl von der Ausgangskultur als auch von der Suspension bestimmt.

8. Das Einfrieren (Langsam- und Schnellmethode)

Langsammethode: Die abgefüllten Lyophilisationsampullen wurden zunächst bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ 15 - 20 Minuten vorgekühlt und dann bei $- 20^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Dabei wurden die Ampullen in der Weise langsam gedreht, daß das Füllgut in gleichmäßiger Schicht an der Wandung erstarrte. Dieser Vorgang dauerte etwa 10 bis 15 Minuten. Bis zum Einbringen in den Lyophilisator wurden die Ampullen ausschließlich bei $- 20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Schnellmethode: Dabei wurden die Ampullen ohne Vorkühlung in ein Kältebad von ca. $- 70^{\circ}\text{C}$ gebracht und wiederum wie bei der Langsammethode gedreht. Nach 2 bis 4 Sekunden war der Vorgang beendet und das Füllgut an der Wand erstarrt. Die Aufbewahrung bis zur Lyophilisation erfolgte im Kältebad (Trockeneis-Alkoholgemisch).

9. Die Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wurde in einer Gefriertrocknungsanlage GT 3 der Firma Leyboldt vorgenommen, die eine genaue Messung des Sättigungsdampfdruckes im Trockenraum ermöglichte. Während der Trockenzeit, die je nach Art des Trockengutes 18 bis 32 Stunden dauerte, schwankte der Druck zwischen 10^{-1} und 10^{-2} Torr, wobei der Kondensator eine Temperatur von ca. $- 50^{\circ}\text{C}$ hatte. Sechs Stunden nach Inbetriebnahme wurde die auf dem Boden des Trockenraumes befindliche Heizplatte auf die Temperatur von $+ 25^{\circ}\text{C}$ eingestellt, wodurch die in einem Aluminiumblock eingestellten Ampullen gleichmäßig beheizt wurden. Gegen Ende des Trocknungsvorganges wurde die Temperatur auf

+ 15° C zurückgenommen.

Das Ende des Trocknungsvorganges ließ sich mit Hilfe eines Thermotrons (Leyboldt) erkennen; es war dann erreicht, wenn der Druckanstiegswert, der in Abständen von einigen Stunden kontrolliert wurde, konstant blieb. Dann erfolgte die Belüftung des Trockenraumes, und die Ampullen wurden an einem Abschmelzrechen unter Vakuum abgeschmolzen. Nach Prüfung des Vakuums der Ampullen mittels eines Hochfrequenztesters wurden diese bei + 4° C im Kühlschrank gelagert.

Direkt nach Beendigung der Lyophilisation und nach jeweils 2 Monaten wurden die Keimzählungen vorgenommen, wobei das Trockengut mit 0,8 ml Aqua dest. aufgelöst wurde. Vor Öffnung der Ampullen wurde jedoch stets das Vakuum erneut geprüft.

10. Bestimmung der Restfeuchte

Um einen Überblick über die nach der Lyophilisation noch vorhandene Restfeuchtigkeit zu erhalten, wurde pro Teststamm und Schutzmedium jeweils eine Trockengutampulle stichprobenweise auf ihren Restfeuchtegehalt untersucht. Da hierfür die notwendigen technischen Einrichtungen im Institut nicht zur Verfügung standen, wurden diese Untersuchungen freundlicherweise von den Behringwerken / Marburg* übernommen.

Die folgenden Ergebnisse der mit Hilfe der Karl-Fischer-Methode durchgeführten Restwassergehaltsbestimmungen stellten die Mittelwerte von 3 untersuchten Ampullen dar, die jeweils die drei Teststämme im gleichen Schutzmedium enthielten:

* Ich danke Herrn Dr. Dräger und Herrn Dr. Barth für ihre freundliche Hilfe.

AAF	= 0,9 % H ₂ O
Eidotter	= 1,2 % H ₂ O
PPL0-Bouillon	= 6,4 % H ₂ O
Mixtura desiccans	= 3,6 % H ₂ O
Glukose-Milch	= 3,7 % H ₂ O

11. Untersuchung zur Prüfung der Lebensfähigkeit der Mykoplasmen, die nach Konservierung nicht mehr koloniebildungsfähig waren

Bei meinen Untersuchungen wurde die Lebensfähigkeit der nach den beschriebenen Verfahren konservierten Mykoplasmen durch die Koloniebildung nachgewiesen. Gegen die Folgerung jedoch, daß Mykoplasmen dann nicht mehr als lebensfähig angesehen werden könnten, wenn sie keine Kolonien mehr zu bilden vermochten, waren aus mehreren Gründen Bedenken zu erheben:

1. konnte durch Konservierungseinflüsse nur noch eine so geringe Überlebensrate vorhanden sein, daß die wenigen lebenden Keime nicht mehr auf den Kulturplatten erfaßt wurden.
2. mußte mit Wachstumsverzögerungen der Kolonien gerechnet werden, wie sie von KELTON (23) nach Kältekonservierung beobachtet worden waren. Dadurch bestand die Gefahr, daß nach 3 tägiger Bebrütung die Kolonien noch nicht - oder doch wenigstens noch nicht alle - erkennbar waren, und 3. konnte eine derartige Schädigung des Koloniebildungsvermögens eingetreten sein, daß die Kolonien wegen zu geringer Größe überhaupt nicht mehr sichtbar wurden. Diese Vermutung ließ sich auch durch die Beobachtung stützen, daß die Teststämme nach steigender Konservierungsdauer eine immer stärkere Tendenz zur Bildung untypischer Kolonieformen von geringer Größe zeigten. Um dadurch hervorgerufene Fehlbeurteilungen auszuschließen, wurden alle mykoplasmenhaltigen Substrate dann nochmals über 5-6 Tage bebrütete Hühnereier passagiert, wenn sie

nach entsprechender Lagerung keine erkennbare Koloniebildung mehr zeigten. Diese Methode zur Prüfung der Lebensfähigkeit konnte als besonders empfindlich gelten, da das Hühnerei das bisher bestgeeignetste Kulturmedium für Schweinemykoplasmen darstellt. Nach im hiesigen Institut stammenden Erfahrungen gelangen selbst sehr geringe Keimmengen auf diese Weise wieder zur Vermehrung und Anreicherung. Die Beimpfung, weitere Bebrütung, Öffnung der Eier, Prüfung des Eimaterials auf Koloniewachstum erfolgte in schon beschriebener Weise. Es sei betont, daß die beimpften Eier auch dann kulturell geprüft wurden, wenn sie nicht in der Beobachtungszeit abgestorben waren.

B. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

Die bei den verschiedenen Konservierungsarten ermittelten Überlebensraten wurden in den Tabellen I bis XIV dargestellt.
(s. Anhang)

a. Konservierung bei Zimmertemperatur (Tab.I,II u. III s.Anhang)

Die in Eidotter konservierten Stämme Switzer und 62 L vermochten bis zum 18., Stamm Bakos sogar bis zum 22. Lagerungstage Kolonien zu bilden. Die tatsächliche Überlebenszeit verlängerte sich jedoch um jeweils 4 Tage, denn noch am 22., bzw. am 26. Tage waren die Stämme auf Hühnereiern vermehrungsfähig. Erst am 24. bzw. 28. Tage war ein Mykoplasmennachweis nicht mehr möglich.

Wie am Kurvenverlauf zu sehen (Abb. 2 u. 3), war der größte Keimverlust nach 2 tägiger Lagerung entstanden, insbesondere bei Stamm Switzer, der 65 % bzw. 50 % der ursprünglich in AAF und Dotter vorhandenen Keimmenge verloren hatte.

Ein deutlicher Eignungsunterschied der beiden Eimедien war nur für den Stamm Bakos festzustellen, welcher in Dottermaterial 6 Tage länger koloniebildungsfähig (und damit auch lebensfähig) war als in AAF.

Die bei der Zählung gesehenen Kolonien waren recht vielgestaltig und hatten eine Größe, die sich etwa zwischen 20 und 200 μ bewegte. Neben runden, glattrandigen und glänzenden Kolonien, die in ein deutlich abgesetztes, dichter erhabenes Zentrum und in eine transparentere Randzone gegliedert waren, kamen nach längerer Lagerung immer zahlreicher untypische Formen vor, wie sie von HARTWICH und MÜLLER (18) bereits beschrieben und als Kolonieform I und II bezeichnet worden waren.

Die Kolonieform I war besonders klein (etwa 20 bis 60 μ), ziemlich hoch gewölbt, von rauher Oberfläche und mit unregelmäßigem, gezacktem oder gelapptem Rande. Die Kolonieform II war zumeist größer (bis zu 120 μ), oftmals sehr flach, so daß sie sich wenig von der Agaroberfläche abhob, und hatte zumeist

einen gelappten Rand. Eine kleine zentrale Erhebung war fast stets vorhanden. Daneben wurden auch verschiedenartige Übergangsformen beobachtet, wobei alle diese Koloniebilder oftmals nebeneinander auf der gleichen Platte vorkamen.

b. Konservierung im Kühlschrank bei + 4° C (Tab. IV, V u. VI s. Anhang)

Die Lebensdauer, besonders der in Eidotter konservierten Stämme, war recht unterschiedlich: der Stamm Switzer bildete noch nach 70 Tagen Kolonien, der Stamm 62 L dagegen nur noch am 60. Tage. Die Mittelstellung nahm der Stamm Bakos ein, der bis zum 65. Tage koloniebildungsfähig blieb. Nach Verlust des Koloniebildungsvermögens waren jedoch sämtliche Proben (Dotter und AAF) noch recht einheitlich etwa 8 Tage lang auf Hühner-eiern vermehrungsfähig. Der Kurvenverlauf der Keimverluste ist in den Abb. 4 und 5 ersichtlich: Schon nach 20 tägiger Lagerung war der Lebendkeimgehalt aller Proben unter 10 % des Ausgangskeimgehaltes gesunken, um sich dann allerdings sehr langsam und kontinuierlich zu verringern.

Als deutlich besser geeignet erwies sich Eidotter, worin der Stamm Bakos sogar 20 Tage länger koloniebildungsfähig (und damit auch lebensfähig) blieb als in AAF.

Schon bei der 1. Keimzählung, also nach 10 tägiger Lagerung, waren untypische Kolonieformen sichtbar, die bei späteren Zählungen anteilmäßig zur Gesamtmenge immer mehr in den Vordergrund traten.

Abb. 2

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei + 20° C in A A F

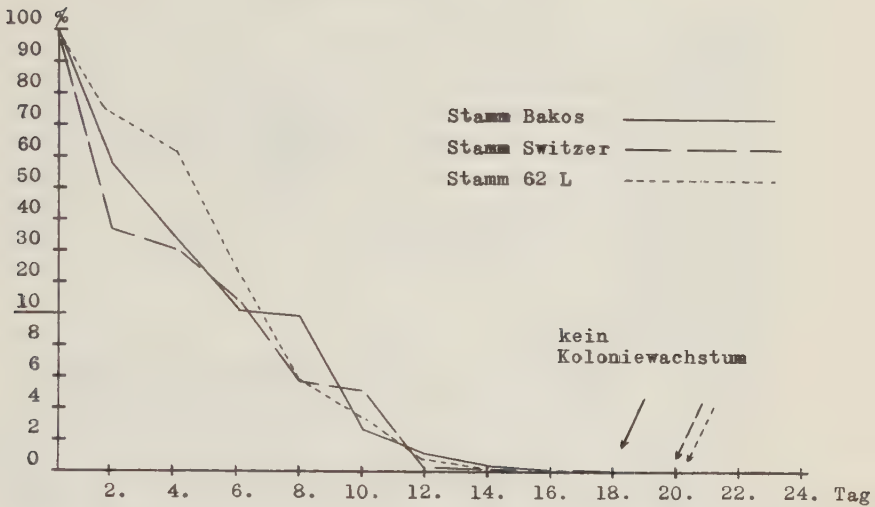


Abb. 3

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei + 20° C in Eidotter

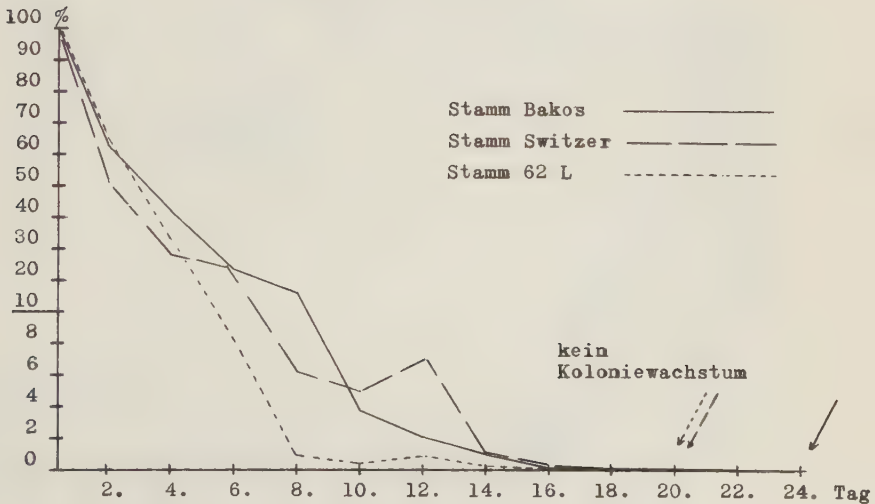


Abb. 4

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei + 4° C in A A F

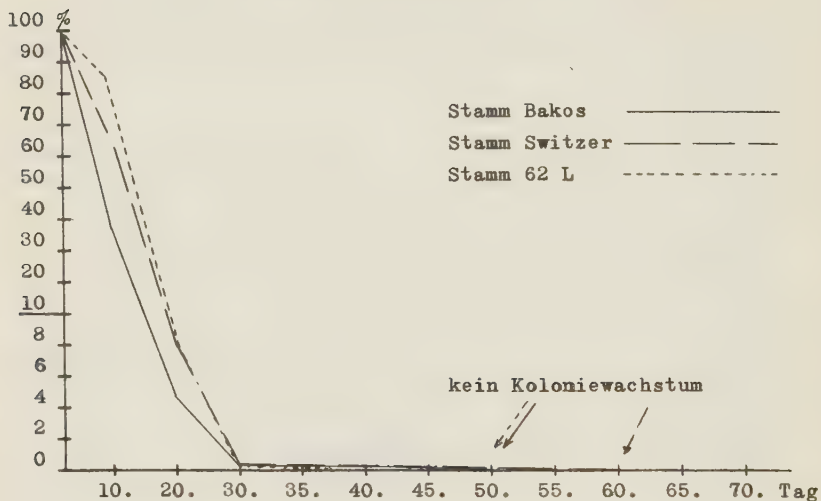
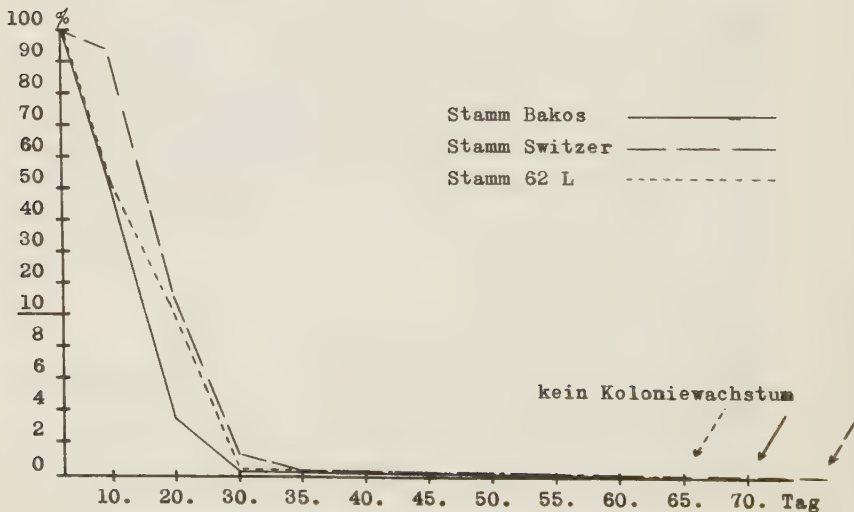


Abb. 5

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei + 4° C in Eidotter



c. Konservierung bei - 20° C (Tab. VII, VIII u. IX s. Anhang)

Da die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nach 8 Monaten abgeschlossen wurden, konnte die Überlebenszeit der bei - 20° C gelagerten Mykoplasmenstämme nicht voll ermittelt werden. Noch nach 8 monatiger Lagerung wurden von den Stämmen Bakos (AAF und Dotter) und Switzer (Dotter) Kolonien gebildet. Stamm 62 L dagegen war nach dem 6. Monat (AAF) bzw. 7. Monat (Dotter) nicht mehr koloniebildungsfähig. Alle Proben konnten jedoch noch nach 8 Monaten auf Hühnereiern angezüchtet werden.

Wie der Kurvenverlauf der Abb. 6 und 7 zeigt, war Eidotter als Konservierungsmedium besser geeignet als AAF. Nicht nur die Koloniebildungsfähigkeit blieb in diesem Substrat bei allen Stämmen länger erhalten, sondern auch die Zahl der überlebenden Keime war fast stets höher. Die in Eidotter konservierten Stämme Bakos und Switzer hatten sogar noch nach 3 Monaten einen Lebendkeimgehalt von über 10 % der ursprünglichen Keimzahlen.

Schon bei der 1. Koloniezählung nach 1 monatiger Lagerung waren nur noch wenige typische Mykoplasmenkolonien gewachsen, späterhin konnten fast stets nur die untypischen Formen I und II gesehen werden.

Abb. 6

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei -20°C in A A F

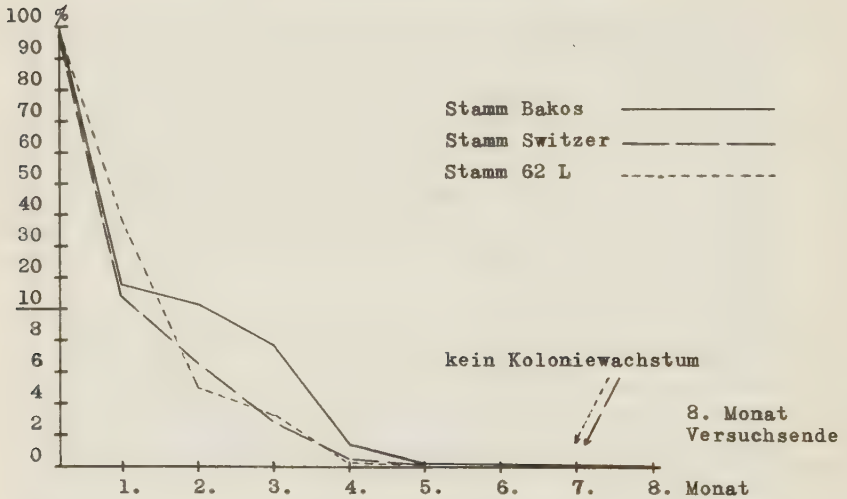
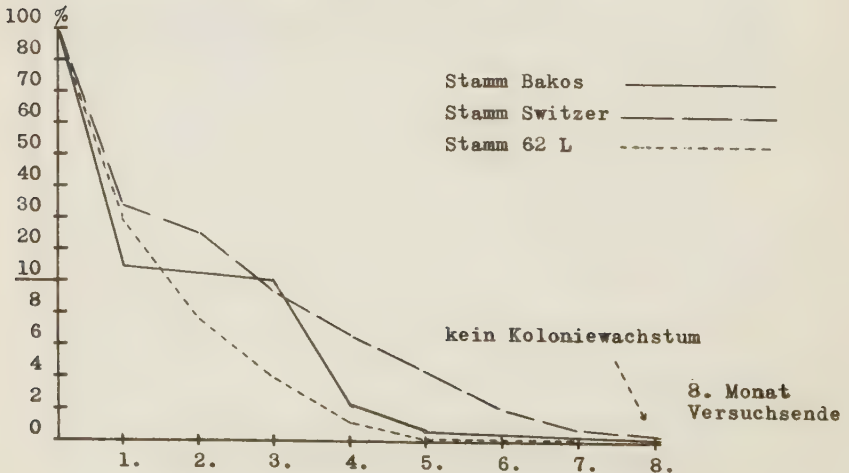


Abb. 7

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei -20°C in Eidotter



d. Konservierung bei - 30° C (Tab. X, XI u. XII s. Anhang)

Auch bei diesen Untersuchungen konnten aus schon im vorigen Abschnitt genannten Gründen die vollen Überlebenszeiten nicht ermittelt werden. Wenngleich die Stämme Bakos und 62 L schon vor dem Versuchsende keine Kolonien mehr zu bilden vermochten (Bakos in AAF nach dem 5., 62 L in Dotter nach dem 5. bzw. in AAF nach dem 6. Lagerungsmonat), so waren sie doch noch nach 8 Monaten (Versuchsende) auf Hühnereiern anzüchtbar.

Im übrigen war aus den Ergebnissen dieser Versuche der günstigere Einfluß des Eidottermaterials nur für den Stamm Bakos zu ersehen. Stamm 62 L verlor seine Koloniebildungsfähigkeit im Eidotter sogar einen Monat eher als in AAF, während die für den Stamm Switzer in Dotter anfänglich höheren Überlebensraten sich am Versuchsende in beiden Medien fast glichen. (Abb. 8 und 9)

Hinsichtlich der Kolonieformen wurden die gleichen Beobachtungen gemacht wie bei den Konservierungsversuchen bei - 20° C.

Abb. 8

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei -30°C in A A F

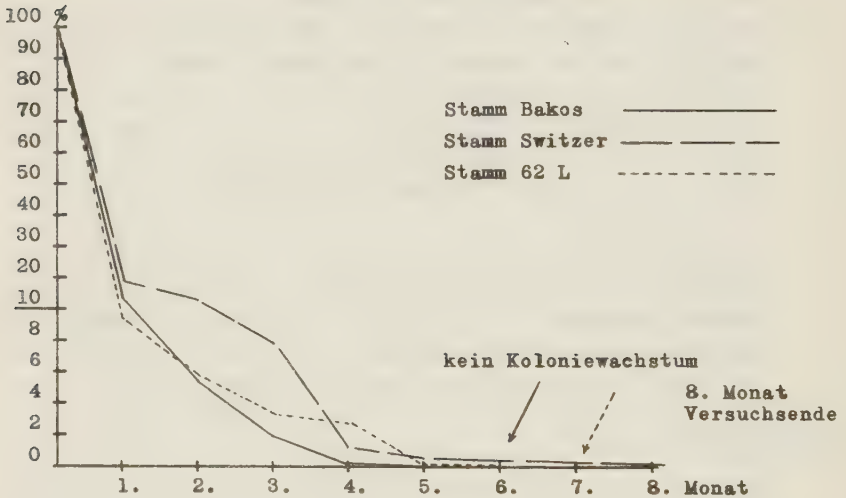
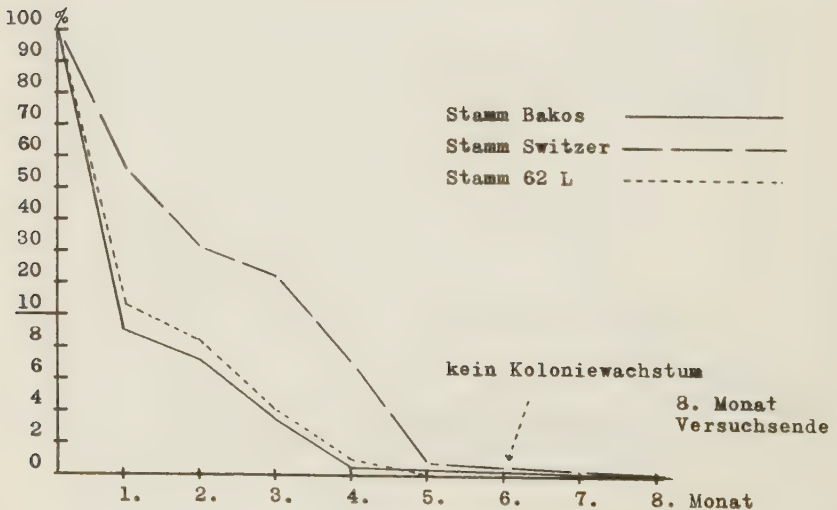


Abb. 9

Keimverlust der Stämme nach Konservierung
bei -30°C in Eidotter

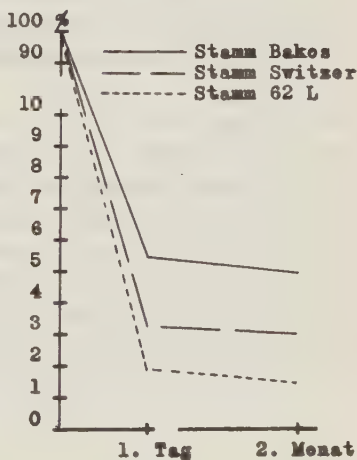
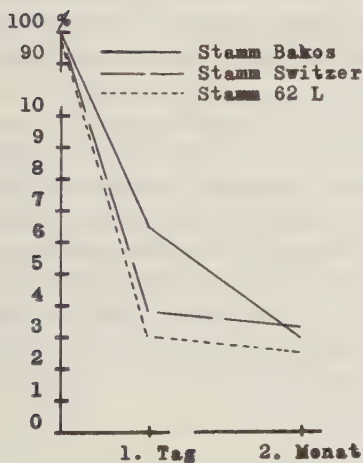


e. Konservierung bei -74°C (Tab. XIII s. Anhang)

Bei diesem über die kurze Zeit von nur 2 Monaten zu übersehenden Versuch wurden 2 Keimzählungen durchgeführt. Aus den Ergebnissen der 1., welche 24 Stunden nach Einlegen des Materials aus Zimmertemperatur in den Temperaturbereich von -74°C erfolgte, wurde deutlich, daß derartige Temperaturstürze von Mykoplasmenstämmen offensichtlich schlecht vertragen werden. Die höchste Überlebensrate lag bei 6,3 % (Stamm Bakos) und die niedrigste bei 1,9 % (Stamm 62 L). Auch die Kolonien wuchsen nach 24 Stunden bereits sehr untypisch. Die Ergebnisse der 2 Monate später erfolgten 2. Auszählung ließen vermuten, daß der nach weiterer Lagerung noch zu erwartende Keimverlust verhältnismäßig langsam und allmählich auftreten dürfte.

Abb. 10

Keimverlust der Stämme nach Konservierung bei -74°C
in AAF in Eidotter



f. Gegenüberstellung der Überlebensraten nach langsamem und
schnellem Einfrieren und anschließender Lyophilisation
(Tab. XIV s. Anhang)

Die direkt nach Fertigstellung der Lyophilisationsampullen ermittelten sehr niedrigen Überlebensraten bestätigen die schon im vorangegangenen Abschnitt (Konservierung bei -74°C) getroffene Feststellung, daß Mykoplasmen gegen plötzliche Kälteschocks empfindlich sind. Gewisse Stammesunterschiede schienen insofern zu bestehen, als der Stamm 62 L gegenüber den beiden anderen deutlich die höchsten Keimverluste hatte (was auch in Tab. XIII ersichtlich ist).

Der Einfluß des nach dem Einfrieren erfolgten Trocknungsprozesses wirkte sich auf die Überlebensraten der Stämme nur verhältnismäßig geringfügig aus, wie sich durch einen Vergleich der Tabellen XIII und XIV ersehen läßt. Die stärkste Verminderung des Lebendkeimgehaltes hatte auch hierbei der Stamm 62 L.

Das Verfahren des langsamen Einfrierens erbrachte ausnahmslos bessere Ergebnisse, denn die Teststämme hatten in allen Schutzmedien höhere Überlebensraten als bei Anwendung der Methode des schnellen Einfrierens.

Dagegen ließ sich ein Eignungsvergleich der Schutzmedien nur mit Zurückhaltung ziehen; denn die vielfach nur geringfügigen Unterschiede zwischen den durchweg niedrigen Überlebensraten konnten auch auf Fehlern beruhen, die in der Methode des Plattenzählverfahrens begründet waren. Es darf jedoch soviel gesagt werden, daß sich Glukosemilch für die Stämme Bakos und 62 L am wenigsten eignete, der letztere Stamm jedoch in PPLO-Bouillon besonders hohe Überlebensraten hatte. Auch schützte AAF alle Stämme besser als Eidotter.

g. Überlebensraten der lyophilisierten Mykoplasmenstämme
während 6 monatiger Konservierung

Da die Gefriertrocknungsanlage zunächst nicht zur Verfügung stand, konnten die Überlebensraten der lyophilisierten Proben nur während einer 6 monatigen Lagerungsdauer ermittelt werden, indem die Keimzählung alle 2 Monate vorgenommen wurde. Auf eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse konnte jedoch verzichtet werden, da sich die nach der Fertigstellung der Ampullen schon ermittelten Überlebensraten (s. Tab. XIV) auch nach 6 monatiger Lagerung in keinem Falle verringert hatten. Im Gegenteil wirkten sich die in methodischen Mängeln begründeten unvermeidlichen Fehler bei der Koloniezählung zuweilen dahin aus, daß nach längerer Lagerung (nach 2, 4 oder 6 Monaten) höhere Keimzahlen ermittelt wurden, als es nach dem Abschmelzen der Ampullen, d.h. zum Versuchsbeginn, der Fall war. Jedoch hielten sich die Fehler stets unter einem Prozent. Diesen Ergebnissen zufolge darf vermutet werden, daß die bei + 4° C gelagerten, lyophilisierten Mykoplasmen nur sehr allmählich absterben und über lange Zeiten lebensfähig sind. Die Bestätigung dieser Vermutung muß allerdings weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Auf den mit lyophilisiertem Material beimpften Kulturplatten waren typische Kolonien nur selten zu beobachten. Auch ein Einfluß der verschiedenen Schutzmedien auf die Koloniemorphologie war erwartungsgemäß nicht nachweisbar.

C. Besprechung der Ergebnisse

1. Lebensdauer der Stämme

Durch vorangegangene Untersuchungen wurde die Lebensdauer und Überlebensrate von Schweinemykoplasmen ermittelt, die in verschiedenen Temperaturbereichen und nach Gefriertrocknung konserviert worden waren. Dabei konnte festgestellt werden, daß mit Hilfe eines Plattenverfahrens zur Zählung der koloniebildenden Einheiten die volle Lebensdauer der drei Teststämme nicht zu erfassen war. Die gelagerten Proben ließen sich auch stets dann noch eine Zeitlang auf Hühnereiern zur Vermehrung bringen, wenn eine Koloniebildung nicht mehr erkennbar war. Deshalb mußte bei den folgenden Besprechungen zwischen der Koloniebildungs- und Lebensfähigkeit dieser Mikroorganismen unterschieden werden:

Entgegen der vielfach geäußerten Ansicht, daß Schweinemykoplasmen bei Zimmertemperatur nur kurze Zeit lebensfähig seien, hielten sich die Stämme Switzer und 62 L bis zu 18 Tage koloniebildungsfähig, der Stamm Bakos sogar bis zum 22. Tage. Die Lebensfähigkeit verlängerte sich in jedem Falle noch um 4 Tage.

Von den bei Kühlschranktemperatur ($+ 4^{\circ} \text{C}$) konservierten Proben ließen sich noch nach 60 Tagen (Stamm 62 L), 65 Tagen (Stamm Bakos) und 70 Tagen (Stamm Switzer) Kolonien anzüchten. Auf Hühnereiern waren die Stämme noch etwa 8 Tage länger vermehrbar.

Diese Ergebnisse entsprechen etwa denen von KELTON (23), der bei verschiedenen bei $+ 5^{\circ} \text{C}$ gelagerten Mykoplasmenstämmen (1 saprophytischer, 3 aviäre und 1 humaner) eine Lebensfähigkeit von 9 Wochen nachweisen konnte. Damit weniger übereinstimmend waren die Versuche von SWITZER (34) verlaufen, der Stämme von *M. hyorhinis* gewöhnlich nur etwa 3 Wochen lang bei dieser Temperatur halten konnte.

Die Überlebenszeit der bei -20°C , -30°C , -74°C und nach Gefriertrocknung bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagerten Mykoplasmen konnte noch nicht voll bestimmt werden. Als vorläufige Ergebnisse sind zu nennen:

Alle bei -20°C und -30°C gelagerten Proben waren noch nach 8 Monaten lebensfähig. Lediglich ein Stamm (62L) bildete nach 7 bzw. 6 Monaten keine Kolonien mehr.

Nach 2 monatiger Konservierung bei -74°C war das Koloniebildungsvermögen der Stämme noch vorhanden.

Ebenso ließen sich aus sämtlichen lyophilisierten Proben nach halbjährlicher Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ Kolonien anzüchten.

2. Die Eignung der Schutzmedien

Da aus praktischen Gründen die Eignung von Eidottermaterial und AAF als Konservierungsmedien besonders interessierte, (Schweinemycoplasmen werden meist über Hühnereier isoliert), wurden nur diese Substrate bei den Konservierungsversuchen verwendet. Lediglich die Gefriertrocknung der Mykoplasmen erfolgte auch in anderen Schutzmedien (PPLO-Bouillon, Glukosemilch und Mixtura desiccans).

Für die Konservierung bei Zimmertemperatur, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C und -30°C erwies sich Eidotter gegenüber AAF als besser geeignet; sowohl die Lebensdauer als auch die Überlebensrate wurden durch Eidotter günstiger beeinflusst.

Die zumeist nur geringfügigen Unterschiede der nach der *Lyophilisation* ermittelten durchweg sehr niedrigen Überlebensraten ließen nur eine beschränkte Beurteilung der Schutzmedien zu: PPLO-Bouillon war für den empfindlichsten Stamm (62 L) am besten geeignet. In Glukosemilch hatten zwei Stämme (Bakos und 62 L) die niedrigsten Überlebensraten. Im Vergleich zu Eidotter wurden mit AAF durchweg bessere Ergebnisse für alle drei Stämme erzielt.

3. Die Überlebensraten

Nach Einlagerung der Stämme in die verschiedenen Temperaturbereiche wurden zunächst sehr hohe Verluste an lebensfähigen Keimen beobachtet. Ein Abfall auf etwa 10 % der ursprünglich vorhandenen koloniebildenden Einheiten wurde festgestellt:

bei Zimmertemperatur nach 6 - 8 Tagen

bei + 4° C zwischen dem 10. und 20. Tage

bei - 20° C zwischen dem 1. und 2. Monat

bei - 30° C zwischen dem 1. und 3. Monat.

Die weitere Abnahme der Überlebensraten erfolgte dann allmählicher und dem jeweiligen Temperaturbereiche entsprechend immer langsamer. Besonders hohe Verluste entstanden nach plötzlichem Einfrieren des Materials auf - 74° C; schon nach 24 stündiger Lagerung betrugen die Überlebensraten nur noch zwischen 6,3 und 1,9 %. Auch KELTON (23) konnte einen sehr hohen Verlust nach Lagerung bei - 65° C bei einem aviären Mykoplasmenstamm beobachten. Dieser hatte nach 12 Monaten 90 % der ursprünglich vorhandenen lebensfähigen Einheiten verloren, wobei 85 % dieses Verlustes schon nach 1 monatiger Lagerung entstanden waren. Den Ergebnissen nach eintägiger Lagerung bei - 74° C entsprechend, verliefen auch die Vergleichsuntersuchungen zwischen der Methode des langsamen und schnellen Einfrierens bei anschließender Gefriertrocknung:

Das Langsam-Verfahren erbrachte ausnahmslos bessere Ergebnisse, denn die Teststämme hatten in allen Schutzmedien höhere Überlebensraten als bei der Anwendung der Schnell-Methode. Die Feststellung hatte schon FLIR (11) bei gleichartigen Versuchen mit Geflügelmykoplasmen getroffen, wobei allerdings die ermittelten Überlebensraten wesentlich höher lagen: Nach 4 monatiger Lagerung bei + 4° C wurden noch 42,3 % (in Glukosemilch) und 89,9 % (in Mixt. desicc.) festgestellt.

Dagegen wurden bei den drei Teststämmen direkt nach Beendigung der Gefriertrocknung sehr niedrige Überlebensraten gefunden.

Je nach Stamm und Schutzmedium lagen sie zwischen 9,4 % und 0,2 %. Die weitere 6 monatige Lagerung der Proben bei + 4° C hatte dann allerdings in keinem Falle zu weiteren Verlusten geführt.

4. Beeinflussung der Koloniebildung

Unter dem Einfluß aller Konservierungsarten kam es bei den drei Stämmen stets zu einer Veränderung der zunächst typischen Kolonien. Mit zunehmender Lagerungsdauer traten sehr kleine uncharakteristische Koloniefornen auf, wie sie HARTWICH und MÜLLER (18) beschrieben haben.

Kümmerformen bei Mykoplasmen anderer Herkunft konnte auch KELTON (23) beobachten, wenn die Stämme bei - 26° C gelagert worden waren. FLIR (11) sah bei *Mixtura desiccans*-lyophilisierten Geflügelmykoplasmen ebenfalls besonders kleine Kolonien.

Abschließend soll als praktisch bedeutungsvoll herausgehoben werden, daß die zeitlichen Zwischenräume der zur Stammerhaltung von Schweinemykoplasmen notwendigen Eipassagen auf 8 Monate ausgedehnt werden können, wenn das Eimaterial bei - 20° C bzw. - 30° C gelagert wird. Darüberhinaus empfiehlt sich die Konservierung lyophilisierten Materials, denn nach den bisherigen Ergebnissen steht zu erwarten, daß sich Mykoplasmen des Schweines im gefriergetrocknetem Zustand wesentlich länger als 6 Monate lebensfähig halten. Die Verwendung eines besonderen Schutzmediums ist nicht erforderlich, da die Überlebensrate von in AAF lyophilisierten Stämmen nicht niedriger lag als in den anderen erprobten Medien.

Durch das für symbiontisch wachsende Mykoplasmen entwickelte Verfahren zur Keimzählung bietet sich eine Möglichkeit, die Keimmengen für Tierversuche, Antikörpergewinnung usw. genau zu bestimmen.

D. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß verschiedener Konservierungsmethoden auf einen amerikanischen, schwedischen und deutschen Schweinemykoplasmenstamm untersucht. Mit Hilfe eines Plattenzählverfahrens und durch Hühnereieimpfung ließ sich der Verlauf des Keimabfalles und die Lebensdauer der in Eidotter und Allantois-Amnion-Flüssigkeit bei den in Zimmertemperatur und bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ gelagerten Mykoplasmen ermitteln. Außerdem wurden die vorläufigen Ergebnisse nach Konservierung bei $- 20^{\circ}\text{C}$, $- 30^{\circ}\text{C}$, $- 74^{\circ}\text{C}$, nach langsamem und sturzartigem Einfrieren und anschließender Gefriertrocknung in den Schutzmedien AAF, Eidotter, PPLO-Bouillon, Glukosemilch und Mixtura desiccans mitgeteilt:

Bei Zimmertemperatur waren die Stämme bis zu 22 Tagen bzw. 26 Tagen, bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ bis zu 68, 73, und 78 Tagen lebensfähig. Noch nach 8 Monaten waren alle drei Stämme nach Lagerung bei $- 20^{\circ}\text{C}$ und $- 30^{\circ}\text{C}$ auf Hühnereiern anzüchtbar. Mit dem Verfahren des langsamen Einfrierens ließen sich die Lebendkeimverluste niedriger halten als durch sturzartiges Einfrieren. Die Überlebensrate war nach dem Gefriertrocknungsprozeß stets sehr niedrig (von 9,4 % bis zu 0,2 %), jedoch verursachte eine 6 monatige Lagerung dann keine weiteren Verluste. Für die Konservierung bei Zimmertemperatur, $+ 4^{\circ}\text{C}$, $- 20^{\circ}\text{C}$ und $- 30^{\circ}\text{C}$ eignete sich Eidotter besser als AAF, jedoch verdiente AAF für die Lyophilisation den Vorzug. Alle Konservierungsarten beeinflussten die Koloniebildung, indem mit zunehmender Lagerungsdauer immer mehr kümmerformen auftraten.

IV. Literaturverzeichnis

1. BAKOS,K. : Mitteilung anlässlich des Kolloquiums der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Arbeitsgebiet Mikrobiologie, Parasitologie u. Hygiene, Fachgemeinschaft Hygiene zum Thema:
"Mykoplasmen beim Schwein." 19.5.1965
in Giessen.
2. BAKOS,K. Procédés de diagnostic de la pneumonie
N.E.BJÖRKLUND, enzootique du pork.
K.A.KARLSSON u. Bull. Off. int. Epiz. 58, 281-290 (1962)
Z.DINTER :
3. BAKOS,K. u. Das SEP-Agens. Kongreßberichte XVII. Welt-
Z. Dinter : Tierärzte-Kongreß (Hannover 1963)
549-553 (1963)
4. BRIDRÉ,J. u. Le microbe de l'agalaxie contagieuse et
A. DONATIEN : sa culture in vitro.
Compt. rend. 177, 841-843 (1923)
5. CONRAD,R.D. : Lyophilization of avian pleuropneumonia-
like organisms.
Avian Diseases 2, 132-138 (1958)
6. DINTER,Z. : Ätiologie der enzootischen Pneumonie der
Schweine; vom Virus zum Mycoplasma.
Finsk Veterinärtidskrift 70, 18-25 (1964)
7. DINTER,Z., Über das Verhalten des Virus der enzoo-
K.BAKOS u. tischen Pneumonie der Schweine in der
N.E.BJÖRKLUND : Lunge dieser Tierart.
Mh. Tierhk. 6, 21 (1954)
8. DINTER,Z., Differentiation of porcine Mycoplasma-
D. DANIELSSON u. strains.
K.BAKOS : J. gen. Microbiol., 41, 77-84 (1965)
9. DINTER,Z., Die Kultivierung des SEP-Agens im Dotter-
T.WESSLEN u. sack des Bruteies.
N.LANNEK : Zbl. Vet. Med. 4, 581-587 (1957)
10. EDWARD,D.G. : The pleuropneumonia group of organisms:
A review, together with some new obser-
vations.
J. gen. Microbiol., 10, 27-64 (1954)
11. FLIR,I. : Überlebensraten von Mycoplasma gallinarum
bei Gefriertrocknung.
Vet.med.Diss. Berlin, F.U. (1962)

12. FORTNER, J. : I. Zur Technik der anaeroben Züchtung.
II. Zur Differenzierung der Anaerobier.
Zbl. Bakt. I., Orig., 110, 233-256 (1929)
13. FREUNDT, E.A. : The classification of the pleuropneumonia
groups of organisms (Borrelomycetales).
Inter.Bull. Bact. Nomencl. Taxon. 15,
67 (1955)
14. FRY, R.M. : The influence of the suspending fluid on
the survival of bacteria after drying.
In: Freezing and drying, report of a
symposium 107-115. The Institut of Biol.
London. W.C.I. (1951)
15. GOODWIN, R.F.W.,
A.P. POMEROY u.
P. WHITTLESTONE : Production of enzootic pneumonia in pigs
with a Mycoplasma.
Vet. Rec., 77, 1247-1249 (1965)
16. GOODWIN, R.F.W.,
P. WHITTLESTONE : Production of enzootic pneumonia in pigs
with a micro-organism grown in media free
from living cells.
Vet. Rec., 76, 611-613 (1964)
17. GRAY, D.F. u.
A.W. TURNER : Viability and immunizing potency of freeze-
dried bovine contagious pleuropneumonia
culture-vaccine.
J. Comp. Path., 64, 116-126 (1954)
18. HARTWICH, J. u.
U. MÜLLER : Zur Isolierung von Schweinemycoplasmen mit
Hilfe des Eitestes und der Plattenkultur.
Zbl. Bakt. I. Orig., 197, 532-542 (1965)
19. HARTWICH, J. u.
U. MÜLLER : Über die Verbreitung von Mykoplasmen
beim Schwein.
Tierärztl. Umsch. 21, 103-108 (1966)
20. HARTWIGK, H. : Die chronische Atemkrankheit des Huhnes.
Mh. Tierhk. 2, 20-30 (1959)
21. HARTWIGK, H. : Die enzootische Pneumonie des Schweines
eine Mykoplasmosenose.
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 78,
441-444 (1965)
22. HAYFLICK, L. u.
R. CHANOCK : Mycoplasma species of man.
Bact. Rev. 29, 185-221 (1965)
23. KELTON, W.H. : Storage of mycoplasma strains.
J. Bact. 87, 588-592 (1964)
24. KLAY, M. u.
A. MAYR : Mikrobiologische Untersuchungen von Nasen-
tupferproben und Lungen bei der enzootischen
Pneumonie der Schweine.
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 78,
444-448 (1965)

25. KLIENEBERGER-NOBEL, E. : Pleuropneumonia-like organisms (PPL0)
: Mycoplasmataceae.
Academic Press, London and New York (1962)
26. KÖHLER, W. : Die pleuropneumonienähnlichen Mikroorganismen (PPL0) (pleuropneumonia-like-organisms) Mikromycetaceae. Sammelreferat.
Zbl. Bakt. I. Ref. 175, 103-174 (1960)
27. LANNEK, N. u. T. WESSLEN : Evidence that the SEP-Agent is an aetiological factor in enzootic pneumonia in swine.
Nord. Vet. Med. 9, 177 (1957)
28. LECCE, J.G. : Porcine polyserositis with arthritis isolation of a fastidious pleuropneumonia-like organism and Hemophilus influenzae-suis.
Annals N.Y. Acad. of Sci. 79, 670-676 (1960)
29. L'ECUYER, G., W.P. SWITZER u. E.D. ROBERTS : Microbiologic survey of pneumonic and normal swine lungs.
: Amer. J. Vet. Res. 22, 1020-1025 (1961)
30. MARE, C.J. u. W.P. SWITZER : New Species: Mycoplasma hyopneumoniae, a causative agent of virus pig pneumonia.
Vet. Med. 60, 841-846 (1965)
31. MONREAL, G., G. BOTH u. A. KONZ : Zur Diagnose der enzootischen Pneumonie der Schweine.
: Zbl. Vet. Med. 11, 455-468 (1964)
32. SABIN, A.B. : The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group.
Bact. Rev. 5, 1-67 (1941)
33. SCHIMMEL, D. u. T. HUBRIG : Mykoplasmainfektionen bei Tier und Mensch : unter Berücksichtigung der infektiösen atrophischen Rhinitis der Schweine.
Mh. Vet. Med., 20, 334-338 (1965)
34. SWITZER, W.P. : Studies on infectious atrophic rhinitis IV. Charakterization of a pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine.
Amer. J. Vet. Res. 16, 540-544 (1955)
35. SWITZER, W.P. : Sammelreferat: Ferkelkrankheiten (Diseases of Baby Pigs).
Dt. Tierärztl. Wschr. 70, 216-219 (1963)
36. WESSLEN, T. u. LANNEK, N. : The isolation and cultivation in tissue : culture of a cytopathogenic agent from pigs with enzootic pneumonia (so-called virus pneumonia). Nord. Vet. Med. 6, 481-499 (1954)

A N H A N G (Tabellen)

Tab.: I

Überlebensraten des Stammes Bakos nach Konservierung
bei Zimmertemperatur

		in A A F		in Eidotter	
Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,18 \times 10^8$	100 %	$1,05 \times 10^8$	100 %
2.	10^{-3} 10^{-4}	$6,76 \times 10^7$	57,0	$6,61 \times 10^7$	62,5
4.	10^{-3} 10^{-4}	$3,96 \times 10^7$	33,4	$4,21 \times 10^7$	39,7
6.	10^{-3} 10^{-4}	$1,32 \times 10^7$	11,1	$2,40 \times 10^7$	22,6
8.	10^{-2} 10^{-3}	$1,22 \times 10^7$	10,2	$1,69 \times 10^7$	15,9
10.	10^{-2} 10^{-3}	$3,33 \times 10^6$	2,8	$3,92 \times 10^6$	3,7
12.	10^{-2} 10^{-3}	$1,81 \times 10^6$	1,5	$2,45 \times 10^6$	2,3
14.	10^{-2} 10^{-3}	$7,35 \times 10^5$	0,65	$1,56 \times 10^6$	1,4
16.	10^{-1} 10^{-2}	$1,07 \times 10^4$	0,009	$2,07 \times 10^5$	0,19

Fortsetzung nächste Seite

Tab.: I (Fortsetzung)

		in A A F		in Eidotter	
Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
18.	10^{-1} 10^{-2}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$8,83 \times 10^4$	0,08
20.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$7,35 \times 10^3$	0,009
22.	10^0 10^{-1}	abgestorben		$4,90 \times 10^2$	0,0004
24.	10^0 10^{-1}			Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
26.				Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
28.				abgestorben	

Tab.: II

Überlebensraten des Stammes Switzer nach Konservierung
bei Zimmertemperatur

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$3,25 \times 10^8$	100 %	$1,06 \times 10^8$	100 %
2.	10^{-3} 10^{-4}	$1,16 \times 10^8$	35,8	$5,34 \times 10^7$	50,0
4.	10^{-3} 10^{-4}	$9,89 \times 10^7$	30,4	$3,03 \times 10^7$	28,4
6.	10^{-3} 10^{-4}	$3,96 \times 10^7$	12,2	$2,54 \times 10^7$	23,8
8.	10^{-3} 10^{-4}	$1,86 \times 10^7$	5,7	$6,37 \times 10^6$	5,9
10.	10^{-2} 10^{-3}	$1,47 \times 10^7$	4,5	$5,48 \times 10^6$	5,1
12.	10^{-2} 10^{-3}	$6,86 \times 10^5$	0,2	$7,46 \times 10^6$	6,9
14.	10^{-1} 10^{-2}	$2,94 \times 10^4$	0,009	$1,61 \times 10^6$	1,5
16.	10^{-1} 10^{-2}	$1,91 \times 10^4$	0,005	$4,55 \times 10^5$	0,4

Fortsetzung nächste Seite

Tab.: II (Fortsetzung)

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
18.	10^0 10^{-1}	$6,86 \times 10^2$	0,0002	$4,90 \times 10^3$	0,004
20.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
22.		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
24.		abgestorben		abgestorben	

Tab.: III

Überlebensraten des Stammes 62 L nach Konservierung
bei Zimmertemperatur

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,09 \times 10^8$	100 %	$1,03 \times 10^8$	100 %
2.	10^{-3} 10^{-4}	$8,52 \times 10^7$	77,6	$7,20 \times 10^7$	69,2
4.	10^{-3} 10^{-4}	$6,61 \times 10^7$	60,2	$3,13 \times 10^7$	30,6
6.	10^{-3} 10^{-4}	$2,64 \times 10^7$	24,1	$8,33 \times 10^6$	8,0
8.	10^{-2} 10^{-3}	$6,37 \times 10^6$	5,8	$1,01 \times 10^6$	0,9
10.	10^{-2} 10^{-3}	$3,87 \times 10^6$	3,5	$5,88 \times 10^5$	0,5
12.	10^{-2} 10^{-3}	$1,02 \times 10^6$	0,9	$9,31 \times 10^5$	0,8
14.	10^{-1} 10^{-2}	$3,03 \times 10^5$	0,2	$3,23 \times 10^5$	0,3
16.	10^{-1} 10^{-2}	$6,37 \times 10^4$	0,05	$2,45 \times 10^5$	0,2

Fortsetzung nächste Seite

Tab.: III (Fortsetzung)

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
18.	10^0 10^{-1}	$4,90 \times 10^2$	0,0004	$4,99 \times 10^3$	0,004
20.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
22.		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
24.		abgestorben		abgestorben	

Tab.: IV

Überlebensraten des Stammes Bakos nach Konservierung
bei + 4° C

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,18 \times 10^8$	100 %	$1,05 \times 10^8$	100 %
10.	10^{-3} 10^{-4}	$4,55 \times 10^7$	38,4	$5,39 \times 10^7$	50,9
20.	10^{-2} 10^{-3}	$5,53 \times 10^6$	4,6	$3,72 \times 10^6$	3,5
30.	10^{-2} 10^{-3}	$1,51 \times 10^5$	0,12	$5,19 \times 10^5$	0,49
35.	10^{-1} 10^{-2}	$1,49 \times 10^5$	0,12	$2,35 \times 10^5$	0,22
40.	10^{-1} 10^{-2}	$4,60 \times 10^4$	0,03	$1,60 \times 10^5$	0,15
45.	10^0 10^{-1}	$5,39 \times 10^2$	0,0004	$5,99 \times 10^4$	0,05
50.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$2,72 \times 10^4$	0,02
55.	10^0 10^{-1}	abgestorben		$7,54 \times 10^3$	0,007

Fortsetzung nächste Seite

Tab.: IV (Fortsetzung)

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
60.	10^0 10^{-1}			$1,51 \times 10^3$	0,001
65.	10^0 10^{-1}			$4,06 \times 10^2$	0,0003
70.	10^0 10^{-1}			Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
75.				abgestorben	

Tab.: V

Überlebensraten des Stammes Switzer nach Konservierung
bei + 4° C

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$3,25 \times 10^8$	100 %	$1,06 \times 10^8$	100 %
10.	10^{-3} 10^{-4}	$2,23 \times 10^8$	68,6	$1,00 \times 10^8$	94,5
20.	10^{-2} 10^{-3}	$2,44 \times 10^7$	7,5	$2,06 \times 10^7$	19,2
30.	10^{-2} 10^{-3}	$7,20 \times 10^5$	0,2	$1,27 \times 10^6$	1,2
35.	10^{-1} 10^{-2}	$2,54 \times 10^5$	0,07	$5,39 \times 10^5$	0,5
40.	10^{-1} 10^{-2}	$1,25 \times 10^5$	0,03	$3,20 \times 10^5$	0,3
45.	10^0 10^{-1}	$1,03 \times 10^4$	0,003	$3,00 \times 10^5$	0,2
50.	10^0 10^{-1}	$2,94 \times 10^3$	0,0009	$1,37 \times 10^4$	0,01
55.	10^0 10^{-1}	$1,07 \times 10^3$	0,0003	$1,14 \times 10^4$	0,01

Fortsetzung nächste Seite

Tab.: V (Fortsetzung)

		in A A F		in Eidotter	
Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
60.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$8,91 \times 10^3$	0,008
65.	10^0 10^{-1}	abgestorben		$6,32 \times 10^3$	0,006
70.	10^0 10^{-1}			$5,88 \times 10^2$	0,0005
75.	10^0 10^{-1}			Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
80.				abgestorben	

Tab.: VI

Überlebensraten des Stammes 62 L nach Konservierung
bei $+ 4^{\circ} \text{C}$

Auszählung n. Tagen	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,09 \times 10^8$	100 %	$1,03 \times 10^8$	100 %
10.	10^{-3} 10^{-4}	$9,26 \times 10^7$	84,3	$5,39 \times 10^7$	51,8
20.	10^{-2} 10^{-3}	$8,52 \times 10^6$	7,7	$1,65 \times 10^7$	14,8
30.	10^{-2} 10^{-3}	$2,64 \times 10^5$	0,2	$5,39 \times 10^5$	0,5
35.	10^{-1} 10^{-2}	$3,38 \times 10^4$	0,03	$1,45 \times 10^5$	0,1
40.	10^{-1} 10^{-2}	$9,80 \times 10^3$	0,008	$1,04 \times 10^5$	0,1
45.	10^0 10^{-1}	$3,92 \times 10^2$	0,0003	$2,32 \times 10^4$	0,02
50.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$1,00 \times 10^4$	0,009
55.	10^0 10^{-1}	abgestorben		$4,65 \times 10^3$	0,004
60.	10^0 10^{-1}			$5,88 \times 10^2$	0,0005
65.	10^0 10^{-1}			Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
70.				abgestorben	

Tab.: VII

Überlebensraten des Stammes Bakes nach Konservierung
bei - 20° C

		in A A F		in Eidotter	
Auszählung n. Monaten	Verdünnungen	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,35 \times 10^8$	100 %	$1,18 \times 10^8$	100 %
1.	10^{-3} 10^{-4}	$2,57 \times 10^7$	18,3	$1,86 \times 10^7$	15,6
2.	10^{-2} 10^{-3}	$1,48 \times 10^7$	10,8	$1,73 \times 10^7$	14,6
3.	10^{-2} 10^{-3}	$1,02 \times 10^7$	7,5	$1,35 \times 10^7$	11,4
4.	10^{-2} 10^{-3}	$2,19 \times 10^6$	1,6	$2,39 \times 10^6$	2,0
5.	10^{-1} 10^{-2}	$2,80 \times 10^5$	0,2	$9,53 \times 10^5$	0,8
6.	10^{-1} 10^{-2}	$1,59 \times 10^5$	0,1	$2,42 \times 10^5$	0,2
7.	10^0 10^{-1}	$2,65 \times 10^4$	0,01	$6,06 \times 10^4$	0,05
8. Versuchs ende	10^0 10^{-1}	$1,16 \times 10^4$	0,008	$2,62 \times 10^4$	0,02

Tab.: VIII

Überlebensraten des Stammes Switzer nach Konservierung
bei - 20° C

Auszählung n. Monaten	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,11 \times 10^8$	100 %	$8,50 \times 10^7$	100 %
1.	10^{-3} 10^{-4}	$1,58 \times 10^7$	14,2	$3,03 \times 10^7$	35,6
2.	10^{-2} 10^{-3}	$7,61 \times 10^6$	6,8	$2,28 \times 10^7$	26,9
3.	10^{-2} 10^{-3}	$2,73 \times 10^6$	2,4	$8,97 \times 10^6$	10,5
4.	10^{-2} 10^{-3}	$7,50 \times 10^5$	0,6	$5,51 \times 10^6$	6,4
5.	10^{-1} 10^{-2}	$2,54 \times 10^4$	0,02	$4,21 \times 10^6$	4,9
6.	10^{-1} 10^{-2}	$6,71 \times 10^3$	0,006	$1,66 \times 10^6$	1,9
7.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$5,97 \times 10^5$	0,7
8. Versuchs ende	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$2,25 \times 10^5$	0,3

Tab.: IX

Überlebensraten des Stammes 62 L nach Konservierung
bei - 20° C

Auszählung n. Monaten	Verdünnungen	in A A F		in Eidetter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$2,33 \times 10^8$	100 %	$9,71 \times 10^7$	100 %
1.	10^{-3} 10^{-4}	$8,69 \times 10^7$	37,2	$2,92 \times 10^7$	30,1
2.	10^{-2} 10^{-3}	$1,20 \times 10^7$	5,1	$7,31 \times 10^6$	7,5
3.	10^{-2} 10^{-3}	$8,67 \times 10^6$	3,7	$3,56 \times 10^6$	3,6
4.	10^{-2} 10^{-3}	$1,05 \times 10^6$	0,4	$9,49 \times 10^5$	0,9
5.	10^{-1} 10^{-2}	$3,30 \times 10^5$	0,1	$1,45 \times 10^5$	0,1
6.	10^0 10^{-1}	$1,42 \times 10^4$	0,006	$9,06 \times 10^3$	0,009
7.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$7,84 \times 10^2$	0,0008
8. Versuchs ende	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	

Tab.: X

Überlebensraten des Stammes Bakos nach Konservierung
bei - 30° C

Auszähl- lung n. Monaten	Verdün- nungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überle- bensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überle- bensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,18 \times 10^8$	100 %	$1,05 \times 10^8$	100 %
1.	10^{-3} 10^{-4}	$1,54 \times 10^7$	13,0	$9,57 \times 10^6$	9,0
2.	10^{-2} 10^{-3}	$6,32 \times 10^6$	5,3	$7,12 \times 10^6$	6,7
3.	10^{-2} 10^{-3}	$2,22 \times 10^6$	1,9	$3,03 \times 10^6$	2,8
4.	10^{-1} 10^{-2}	$3,18 \times 10^5$	0,2	$6,79 \times 10^5$	0,6
5.	10^{-1} 10^{-2}	$1,07 \times 10^3$	0,0009	$1,15 \times 10^5$	0,1
6.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$6,72 \times 10^4$	0,06
7.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$3,14 \times 10^4$	0,03
8. Versuchs ende	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		$1,67 \times 10^3$	0,001

Tab.: XI

Überlebensraten des Stammes Switzer nach Konservierung
bei - 30° C

		in A A F		in Eidotter	
Auszählung n. Monaten	Verdünnungen	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$3,25 \times 10^8$	100 %	$1,06 \times 10^8$	100 %
1.	10^{-3} 10^{-4}	$6,39 \times 10^7$	19,6	$6,00 \times 10^7$	56,0
2.	10^{-2} 10^{-3}	$3,91 \times 10^7$	12,0	$3,31 \times 10^7$	31,0
3.	10^{-2} 10^{-3}	$2,47 \times 10^7$	7,6	$2,32 \times 10^7$	21,7
4.	10^{-2} 10^{-3}	$3,75 \times 10^6$	1,1	$8,08 \times 10^6$	7,5
5.	10^{-1} 10^{-2}	$1,60 \times 10^6$	0,5	$8,59 \times 10^5$	0,8
6.	10^{-1} 10^{-2}	$5,90 \times 10^5$	0,18	$3,46 \times 10^4$	0,3
7.	10^0 10^{-1}	$5,02 \times 10^4$	0,01	$2,24 \times 10^4$	0,02
8. Versuchs ende	10^0 10^{-1}	$3,27 \times 10^4$	0,01	$1,01 \times 10^4$	0,009

Tab.: XII

Überlebensraten des Stammes 62 L nach Konservierung
bei - 30° C

Auszählung n. Momaten	Verdünnungen	in A A F		in Eidotter	
		Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
	10^{-3} 10^{-4}	$1,09 \times 10^8$	100 %	$1,03 \times 10^8$	100 %
1.	10^{-3} 10^{-4}	$1,01 \times 10^7$	9,2	$1,57 \times 10^7$	15,1
2.	10^{-2} 10^{-3}	$6,31 \times 10^6$	5,7	$9,37 \times 10^6$	9,0
3.	10^{-2} 10^{-3}	$3,55 \times 10^6$	3,2	$4,55 \times 10^6$	4,3
4.	10^{-2} 10^{-3}	$3,19 \times 10^6$	2,9	$1,24 \times 10^6$	1,1
5.	10^{-1} 10^{-2}	$1,56 \times 10^5$	0,1	$2,94 \times 10^4$	0,02
6.	10^0 10^{-1}	$2,08 \times 10^4$	0,01	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
7.	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	
8. Versuchsende	10^0 10^{-1}	Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei		Kein Koloniewachstum Vermehrung im Ei	

Tab.: XIII

Überlebensraten der 3 Teststämme nach Konservierung
bei - 74° C

Stamm Bakos

	in A A F		in Eidotter	
Auszählungen nach	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %	Ausgezählte Keime pro ml	Überlebensrate in %
Ausgangs-keimzahl	$1,31 \times 10^8$	100 %	$9,92 \times 10^7$	100 %
1. Tag	$8,33 \times 10^6$	6,3	$5,46 \times 10^6$	5,5
2. Monat	$3,66 \times 10^6$	2,9	$5,10 \times 10^6$	5,0

Stamm Switzer

Ausgangs-keimzahl	$1,34 \times 10^8$	100 %	$1,18 \times 10^8$	100 %
1. Tag	$5,29 \times 10^6$	3,9	$4,10 \times 10^6$	3,4
2. Monat	$4,60 \times 10^6$	3,4	$3,63 \times 10^6$	3,0

Stamm 62 L

Ausgangs-keimzahl	$1,15 \times 10^8$	100 %	$9,26 \times 10^7$	100 %
1. Tag	$3,47 \times 10^6$	3,0	$1,98 \times 10^6$	1,9
2. Monat	$2,84 \times 10^6$	2,4	$1,62 \times 10^6$	1,7

Tab.: XIV

Gegenüberstellung der Überlebensrate nach langsamem und schnellem Einfrieren und anschließender Gefriertrocknung

	Stamm Bakos		Stamm Switzer		Stamm 62 L	
<u>Medium</u>	Einfrieren langsam schnell		Einfrieren langsam schnell		Einfrieren langsam schnell	
A A F	5,0 %	4,2 %	7,3 %	4,2 %	1,0 %	0,6 %
Eidotter	4,3 %	2,7 %	4,1 %	3,9 %	0,5 %	0,3 %
PPL0- Bouillon	5,1 %	2,3 %	7,1 %	2,8 %	9,4 %	3,3 %
Glukose- milch	1,0 %	0,4 %	6,0 %	2,4 %	0,4 %	0,2 %
Mixtura desiccans	2,1 %	1,8 %	9,3 %	5,4 %	1,1 %	0,6 %

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. Ulbrich,
möchte ich für die Überlassung des Themas und des
Arbeitsplatzes sowie für seinen Rat und seine
Unterstützung recht herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. J. Hartwich für
seine Anleitung und Anregungen.

L e b e n s l a u f

Am 27. Mai 1938 wurde ich, Martin Scheer, als Sohn des Lehrers Ernst Scheer und seiner Ehefrau Clara, geborene Lehmann, in Gräfenhainichen/Bez. Halle geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und der Oberschule in Gräfenhainichen legte ich im Sommer 1956 die Reifeprüfung ab. Da meine Bewerbungen für das Studium der Veterinärmedizin an den Veterinärmedizinischen Fakultäten in Leipzig und Berlin abgelehnt wurden, begann ich eine kaufmännische Lehre.

Am 10. Juni 1957 siedelte ich in die Bundesrepublik über, arbeitete hier zunächst ein halbes Jahr in der Landwirtschaft und legte am 13. März 1958 am Realgymnasium für Jungen in Marburg/Lahn eine Ergänzungsprüfung zu meinem Abitur ab.

Von 1958 bis 1963 studierte ich in Gießen Veterinärmedizin; bestand im Frühjahr 1960 die Tierärztliche Vorprüfung und im Frühjahr 1963 die Tierärztliche Prüfung.

Nach Ableistung meiner Praktikantenzeit bei Herrn Dr. N. Hofmann, Präsident der Tierärztekammer Saar in Nohfelden, erhielt ich mit Wirkung vom 14. November 1963 die Approbation als Tierarzt.

Bis Juni 1965 war ich als Assistent in Norddeutschland, im Saargebiet und am Niederrhein in der tierärztlichen Praxis tätig.

Ab Juli 1965 war ich am Veterinärhygienischen- und Tierseuchen-Institut der Universität in Gießen mit der Anfertigung meiner Dissertation beschäftigt.

Ab 1. Januar 1966 trat ich dann als wissenschaftlicher Mitarbeiter in dieses Institut ein.

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546